

Einfluss des Weihrauchextraktes H15 auf die Wachstumskinetik hirneigener Tumoren bei Wistar-Ratten

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Sarikaya-Seiwert, Sevgi
aus Herborn

Gießen 2009

Aus dem Medizinischen Zentrum
für Neurologie und Neurochirurgie
Neurochirurgische Klinik
Leiter: Prof. Dr. D.-K. Böker
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen

Gutachter: Prof. Dr. M. Winking

Gutachter: Prof. Dr. W. Wößmann

Tag der Disputation: 06.04.2010

Meinem Mann gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	16
1.1	Allgemeines.....	16
1.2	WHO-Klassifikation maligner Gliome.....	17
1.3	Histologie und Molekularpathologie astrozytischer Tumoren	19
1.3.1	Histologie.....	19
1.3.2	Molekularpathologie.....	20
1.4	Astrozytische Tumoren	25
1.4.1	Diffuses Astrozytom WHO °II.....	25
1.4.2	Anaplastisches Astrozytom WHO °III.....	26
1.4.3	Oligodendrogliom WHO °II und anaplastisches Oligodendrogliom WHO °III	27
1.4.4	Glioblastoma multiforme	27
1.5	Pathophysiologie von Hirntumoren	49
1.5.1	Blut-Hirn-Schranke.....	49
1.5.2	Entstehung des Hirnödems.....	50
1.5.3	Behandlung des Hirnödems.....	52
1.6	Eikosanoide	53
1.6.1	Arachidonsäure.....	54
1.6.2	Biologische Wirkung der Leukotriene	55
1.6.3	Leukotriene im zentralen Nervensystem	57
1.6.4	Leukotriene im Hirntumorgewebe	57
1.7	Topoisomerasen.....	58
2	WEIHRAUCH	61
2.1	Weihrauch in der Medizin	61
2.1.1	Botanische Grundlagen	62
2.1.2	Weihrauch als Phytopharmakon	63
2.1.3	Gewinnung und Inhaltsstoffe des Weihrauchextraktes	63
2.2	Boswelliasäuren.....	65
2.2.1	Einleitung.....	65
2.2.2	Pharmakologische Wirkung	67
2.2.3	Nebenwirkungen.....	70
3	FRAGESTELLUNG	72
4	MATERIAL UND METHODEN	73
4.1	Versuchsansatz.....	73
4.2	Das C6-Rattengliommodell	73

4.3	Versuchstiere.....	75
4.4	Herstellung der C6-Zellkulturen.....	76
4.5	Technik der Tumorzellimplantation.....	77
4.6	Applikation von H15®	79
4.7	Vitalitätsanalyse und neurologischer Status.....	79
4.8	Explantation des Gehirns.....	81
4.9	Bestimmung des Tumolvolumens	81
4.10	Bestimmung der Apoptose.....	81
4.11	Datenanalyse und Auswertung.....	82
5	ERGEBNISSE.....	84
5.1	Vitalität.....	84
5.1.1	Vitalitätsindex vor Tumorimplantation.....	84
5.1.2	Vitalitätsindex 7 Tage nach Tumorimplantation.....	84
5.1.3	Vitalitätsindex vom 8. bis 14. Tag nach Tumorimplantation.....	84
5.2	Beobachtete Nebenwirkungen.....	92
5.3	Tumorstadium	92
5.4	Tumolvolumen.....	94
5.5	Apoptose	95
6	DISKUSSION.....	96
6.1	Eignung des C6-Gliom Tumormodells.....	96
6.2	Vor- und Nachteile des Phytotherapeutikums H15®	97
6.3	Pharmakokinetik der Boswelliasäuren	99
6.4	Blut-Hirn-Schranke als Barriere	101
6.5	Wirkung der Boswelliasäuren auf die Leukotriensynthese	101
6.6	Vor- und Nachteile der Glukokortikoidtherapie	103

6.7	Wirkung der Boswelliasäuren auf Topoisomerasen	105
6.8	Klinische Relevanz und Aussichten	107
7	ZUSAMMENFASSUNG	109
8	SUMMARY.....	110
9	LITERATURVERZEICHNIS	111
	LEBENS LAUF..... FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.	
	EHRENAMTLICHE ERKLÄRUNG	145
	DANKSAGUNG	146
10	ANHANG	147
10.1	Protokolle.....	147
10.2	Auswertung.....	151
10.2.1	Fluchtreaktion.....	151
10.2.2	Antrieb	158
10.2.3	Neurologisches Defizit.....	165
10.2.4	Aggressivität.....	168

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Molekulargenetische Veränderungen in diffusen astrozytären Gliomen und Glioblastomen.....	29
Abb. 2:	Schematische Darstellung der bei der Initiation und Progression von diffusen astrozytären Gliomen involvierten molekulargenetischen Veränderungen.....	30
Abb. 3:	Koronarer Schnitt durch ein pathologisches Präparat des Gehirns einer Wistar Ratte.....	31
Abb. 4:	HE gefärbte Histologieschnitte der diffusen Astrozytome WHO °II und des sehr zellreichen Glioblastom WHO °IV mit mitotischer Aktivität und pathologischen Tumorgefäßen.....	32
Abb. 5:	MRT-Aufnahmen des Schädels eines Patienten mit einem Glioblastoma multiforme links parietooccipital in der gleichen Schnittebene in verschiedenen Wichtungen.....	34
Abb. 6:	Kernspintomogramm des Schädels und Aminosäure-PET mit FET im Verlauf bei einem Patienten mit einem histologisch nachgewiesenen niedriggradigen Gliom WHO °II im rechten Parietallappen.....	36
Abb. 7:	Vergleich der Darstellung einer Resektion eines malignen Glioms im Operationsmikroskop unter Weißlicht und Fluoreszenzanregung...	41
Abb. 8:	PCV-Zyklus.....	45
Abb. 9:	Temozolomid-Zyklus.....	47
Abb. 10:	Schematische Darstellung der Freisetzung der Arachidonsäure und ihrer Metaboliten.....	53
Abb. 11:	Biosynthese der Leukotriene aus der Ausgangssubstanz Arachidonsäure.....	55
Abb. 12:	Bilder von Boswellia sacra und Boswellia serrata.....	62
Abb. 13:	Harz der Weihrauchpflanze.....	63
Abb. 14:	β-Boswelliasäure, ihre Molekülstruktur und Molekularmassen.....	65
Abb. 15:	Strukturformeln von Acetyl-11-keto-β-boswelliasäure, α-Amyrin, Ursolsäure, Cortison.....	68
Abb. 16:	Fotographie des Stereotaxierahmens.....	76
Abb. 17:	Fotographie von Hamiltonspritzen.....	77

Abb. 18:	Entwicklung des Vitalitätsindex bezogen auf die Fluchtreaktion vom 8. bis 14. Tag in den Behandlungsgruppen A, B, C und D.....	84
Abb. 19:	Veränderung des Vitalitätsindex in den verschiedenen Behandlungsgruppen A, B, C und D in den Behandlungstagen in Bezug auf die Fluchtreaktion.....	85
Abb. 20:	Entwicklung des Vitalitätsindex bezogen auf den Antrieb vom 8. bis 14. Tag in den Behandlungsgruppen A, B, C und D.....	86
Abb. 21:	Veränderung des Vitalitätsindex in den Behandlungsgruppen A, B, C und D vom 10. bis 14. Tag in Bezug auf den Antrieb.....	87
Abb. 22:	Entwicklung des Vitalitätsindex bezogen auf die Aggressivität vom 8. bis 14. Tag in den Behandlungsgruppen A, B, C und	87
Abb. 23:	Veränderung des Vitalitätsindex in den Behandlungsgruppen A, B, C und D vom 10. bis 14. Tag in Bezug auf die Aggressivität.....	89
Abb. 24:	Entwicklung des Vitalitätsindex bezogen auf neurologische Defizite am 13. und 14. Tag in den Behandlungsgruppen A, B, C und D...	89
Abb. 25:	Veränderung des Vitalitätsindex in den Behandlungsgruppen A, B, C und D vom 10. bis 14. Tag in Bezug auf die neurologischen Defizite.....	90
Abb. 26:	Veränderung des Gesamtvitalitätsindex vom 10. bis 14. Tag in den Behandlungsgruppen A, B, C und D.....	91
Abb. 27:	Gehirnschnitt in der koronaren Schnittebene einer Wistar-Ratte in der Behandlungsgruppe mit 60 mg/kg KG/d.....	92
Abb. 28:	Gehirnschnitt in der koronaren Schnittebene einer Wistar-Ratte in der Behandlungsgruppe mit 240 mg/kg KG/d.....	92
Abb. 29:	HE Präparat eines Gehirnschnittes aus der Kontrollgruppe.....	93
Abb. 30:	Tumorzellen in den Behandlungsgruppen A (240 mg/kg KG), B (120 mg/kg KG), C (60 mg/kg KG) und D (0 mg/kg KG) nach C6-Zellimplantation und 14-tägiger Behandlung mit H15.....	93
Abb. 31:	Anzahl apoptotischer C6-Gliomzellen in den Behandlungsgruppen A (240 mg/kg KG), B (120 mg/kg KG), C (60 mg/kg KG) und D (0 mg/kg KG) nach 14-tägiger Behandlung mit H15.....	94

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	WHO-Klassifikation astrozytärer Tumoren nach Kleihues.....	18
Tab. 2:	Histopathologische Kriterien der Gliatumoren.....	19
Tab. 3:	Überlebensraten 2 und 5 Jahre nach Diagnose eines primären Hirntumors.....	38
Tab. 4:	Historische und moderne medizinische Verwendung von Teilen des Weihrauchbaumes.....	61
Tab. 5:	Parameter zur Berechnung des Vitalitätsindex.....	79

Abkürzungsverzeichnis

α -ABA	3-O-Acetyl- α -Boswelliasäure
α -BA	α -Boswelliasäure
ACNU	Nimustin
ADP	Adenosindiphosphat
AESG	Äthanolischer Extrakt von Salai Guggal
5-ALA	5-Aminolävulinsäure
APAF-1	Apoptotic Protease Activating Factor-1
Apo-1	Apoptose-1
AS	Aminosäure
ASS	Acetylsalicylsäure
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
ATRT	Atypisch Teratoid Rhabdoider Tumor
BCNU	Carmustin
β -ABA	3-O-Acetyl- β -Boswelliasäure
β -AKBA	3-Acetyl-11-Keto- β -Boswelliasäure
β -BA	β -Boswelliasäure
β -KBA	Keto- β -Boswelliasäure
BOLD	Blood Oxygen Level Dependency
Ca ⁺⁺	Calcium
Caco-2	Humane Kolon-Adenocarcinoma Zelllinie
CCNU	Lomustin
CCT	Cranial Computer Tomography
CDK	Cyklin-Dependent-Kinase
CDKN	Cyklin-Dependent-Kinase-Inhibitor
CDKN2A	Cyklin-Dependent-Kinase-Inhibitor 2A
CDKN2B	Cyklin-Dependent-Kinase-Inhibitor 2B
CDK6	Cyklin-Dependent-Kinase 6
CDK4	Cyklin-Dependent-Kinase 4
cGMP	cyclo-Guanosinmonophosphat
Cho	Cholin
CKI	Kinase-Inhibitor

CO ₂	Kohlendioxid
CoA	Coenzym A
COX-1	Cyclooxygenase-1
COX-2	Cyclooxygenase-2
CPP	Cerebral Perfusion Pressure
Cr	Creatin
DAG	Diacylglycerol
D-MEM	Dulbecco Modified EAGLE Medium
DNA	Deoxyribonucleotidacid
dUTP	Desoxyuridindiphosphat
EDTA	European Dialysis and Transplant Association
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EGR	Extract from Gum Resin
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
FDG	Fluordesoxyglucose
F-FDG	¹⁸ F-Fluordesoxyglucose
FET	Fluor-Ethyl-Tyrosin
F-FET	¹⁸ F-Fluor-Ethyl-Tyrosin
FLAIR	Fluid Attenuated Inversion Recovery
FSn	Fettsäuren
GBM	Glioblastoma multiforme
Gd-DTPA	Gadolinium-Diethylenetriamine Pentaacetic Acid
Gy	Gray
γ -GPT	γ-Glutamyltranspeptidase
γ- GT	γ-Glutamyltransferase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
5-HPETE	5-Hydroperoxy-6, 8, 11, 14-Eicosatetraensäure
12-HPETE	12-Hydroperoxy-6, 8, 11, 14-Eicosatetraensäure
IC ₅₀	Inhibitory Concentration
IL ₂	Interleukin 2
IMT-SPECT	¹²³ I-α-Methyl-Thyrosine-Single Photon Emission Computer Tomography

IP ₃	Inositolpyrophosphat
ISEL	In Situ End Labeling
kDa	kilo Dalton
Kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
Lat.	Latein
LD ₅₀	mittlere Letale Dosis
LOH	Loss Of Heterozygosity
LTA ₄	Leukotrien A ₄
LTB ₄	Leukotrien B ₄
LTC ₄	Leukotrien C ₄
LTD ₄	Leukotrien D ₄
LTE ₄	Leukotrien E ₄
5-LOX	5-Lipoxygenase
MDM2	Murine-Double Minute 2
MDM4	Murine-Double Minute 4
Mg	Milligramm
MGH	Massachusetts General Hospital
MGMT	O-(6)-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
μl	Mikroliter
μM	Mikromol
MNU	N-Methylnitrourease
mRNA	Messenger Ribonucleotidacid
MRS	MR-Spektroskopie
MRT	Magnetresonanztomographie
NAA	N-Acetylaspartat
NaCl	Natriumchlorid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
MNU	N-Methylnitrosourea
MOP	Manual Optic Planimeter
NO	Stickstoffmonoxid
NOA	Neuroonkologische Arbeitsgemeinschaft der Deutschen Krebsgesellschaft

NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NSAID	Non Steroidal Anti Inflammatory Drugs
O ₂	Sauerstoff
PAF	Platelet Activating Factor
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCV	Procarbazin, CCNU, Vincristin
PDGF α	Platelet Derived Growth Factor alpha
PDGFR α	Platelet Derived Growth Factor Receptor alpha
PET	Positronenemissionstomographie
PG	Prostaglandin
PIP ₂	Phosphoinositolpyrophosphat
PNET	Primitiver Neuroektodermaler Tumor
PMN	Polymorphkernige Neutrophile Leukozyten
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
POS	Phosphatpuffer
PPIX	Protoporphyrin IX
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
RB1	Retinoblastom-Protein
RNA	Ribonucleotidacid
RTOG	Radiation Therapy Oncology Group
S.E.M.	Standard Error of the Mean
SPECT	Single-Photon-Emission- Tomography
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TdT	Terminal-deoxynucleotidyl-Transferase
TGF α	Transforming Growth Factor alpha
TNF	Tumor Necrosis Factor
TUNEL	TdT-mediated-dUTP-biotin Nick End Labeling
UTP	Uridintriphosphat
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR-1	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1
VEGFR-2	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2
VM 26	Teniposid
VP 16	Etoposid

VPF	Vascular Permeability Factor
vs	versus
WHO	World Health Organisation
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Allgemeines

In Deutschland erkranken jährlich bis zu 16.000 Menschen an intrakraniellen Tumoren wie Gliomen, Meningeomen oder Metastasen. Etwa 3 % aller Todesfälle durch Tumorerkrankungen sind durch Hirntumoren bedingt. Hirntumoren werden nach ihrem Ursprungsgewebe differenziert und weiter unterteilt in eine astrozytäre, eine oligodendrozytäre und eine ependymale Reihe sowie in Mischformen. 58 % der primären Hirntumoren sind Gliome neuroepithelialer Herkunft. Die histologische Gradierung unterscheidet dabei niedrig maligne Formen, WHO °I und °II, von einer anaplastischen Form WHO °III und den hochmalignen Astrozytomen WHO °IV (Louis et al., 2007). Die Astrozytome WHO °IV werden als Glioblastoma multiforme bezeichnet (Zülch, 1979).

Maligne Gliome werden durch operative Resektion, Bestrahlung und Chemotherapie behandelt. Ihre Therapie wird erschwert, weil sie die Fähigkeit haben, durch einen ruhenden Zellverband zu migrieren und infiltrativ zu wachsen. Daher verbleiben trotz mikroskopisch vollständiger Resektion Tumorzellen im gesunden Hirngewebe. Aus diesen kleinen Tumorzellverbänden können Rezidive entstehen. Um diese malignen Zellverbände in der weiterführenden adjuvanten Therapie zu erfassen, werden Patienten nach operativer Tumorsektion einer kombinierten Bestrahlung mit Chemotherapie zugeführt. Die Ergebnisse dieser adjuvanten Therapie haben sich in den letzten Jahren gebessert, sind aber weiterhin nicht befriedigend (Stupp et al., 2005).

Glioblastome und hochmaligne Astrozytome werden von einem ausgedehnten perifokalen Ödem begleitet. Dabei besitzen diese Tumoren selbst die Kapazität, durch Bildung von Cysteinyl-Leukotrienen an der Entstehung des peritumoralen Ödems mitzuwirken (Simmet et al., 1990; Winking, 1997). Das perifokale Ödem führt neben dem raumfordernden Effekt des Tumors zusätzlich zur Erhöhung des intrakraniellen Drucks mit Schädigung lebenswichtiger Hirnstrukturen (Ohnishi et al., 1990). Eine Senkung des erhöhten intrakraniellen Drucks als Folge des peritumoralen Ödems hat demnach einen hohen Stellenwert in der Behandlung von Patienten mit einem malignen Hirntumor. Die effiziente konservative Behandlung

des peritumoralen Ödems ist hinsichtlich der Verbesserung der Lebensqualität und der Verlängerung der Lebenszeit von großer Bedeutung (Hill et al., 1995). Zur Reduzierung des perifokalen Ödems und damit des intrakraniellen Drucks werden palliativ Kortikosteroide eingesetzt. Die Behandlung führt bei den meisten Patienten zu einer Verbesserung der Symptome, die durch den erhöhten Hirndruck entstehen (Weller et al., 1997). Die längere Einnahme von Kortikosteroiden in hoher Dosierung kann jedoch zu Nebenwirkungen wie Hypertonus, Diabetes mellitus und zum Cushing-Syndrom führen. Weiterhin können Kortikosteroide die Zytotoxizität und die Wachstumshemmung vieler Chemotherapeutika beeinflussen (Weller et al., 1997). Folglich sollte die Dosis so gering wie möglich gehalten werden.

Mit neuen Chemotherapeutika könnten sowohl in der antiödematösen als auch antiproliferativen Behandlung von Gliomen weitere Fortschritte erzielt werden. Ein vielversprechendes Phytopharmakon zur Behandlung von Gliomen mit antiproliferativer und antiödematöser Wirkung ist das Weihrauchextrakt H15[®]. Das alkoholische Extrakt aus dem Harz der Weihrauchpflanze *Boswellia serrata* enthält Boswelliasäuren. Sie gehören zur Gruppe der Triterpene und hemmen selektiv das Enzym 5-Lipoxygenase, das für die Leukotrienbildung aus der Arachidonsäure verantwortlich ist. Unter der Behandlung mit H15[®] werden weniger Cysteinyl-Leukotriene im Hirngewebe gebildet und freigesetzt, und die Ausprägung des peritumoralen Ödems wird verringert (Winking und Böker 1997). Weiterhin fungiert H15[®] als Topoisomeraseinhibitor. Aufgrund ihrer essentiellen Funktion sind Topoisomerasen geeignete Zielstrukturen für Zytostatika. Topoisomeraseinhibitoren können die Funktion der Topoisomerasen einschränken, so dass es zu Wachstumsdefiziten oder gar einer letalen Zellschädigung kommt. Gliomzelllinien, die mit Boswelliasäuresubtypen in Reinsubstanz inkubiert wurden, zeigten neben der Reduktion des peritumoralen Hirnödems durch Hemmung der 5-Lipoxygenase eine konzentrationsabhängige Wachstumshemmung durch Inhibition der Topoisomerase (Simmet et al., 1989).

1.2 WHO-Klassifikation maligner Gliome

Unter dem Begriff der primären ZNS Tumoren werden eine Vielzahl von Neoplasien des neuroepithelialen Gewebes zusammengefasst. Nach der WHO-Einteilung werden

diese in Kategorien unterteilt, die sich an den Ursprungszellen orientieren (Louis et al., 2007). Die neuroepithelialen Tumoren bilden dabei die größte Gruppe.

Tumoren des neuroepithelialen Gewebes

Astrozytische Tumoren

Astrozytom

- Pilozytisches Astrozytom
- Fibrilläres Astrozytom

Anaplastisches Astrozytom

Glioblastoma multiforme

Pleomorphes Xanthoastrozytom

Subependymales Riesenzellastrozytom

Oligodendrogliale Tumoren

Oligodendrogliom

Anaplastisches Oligodendrogliom

Gemischte Gliome

Oligoastrozytom

Anaplastisches Oligoastrozytom

Ependymale Tumoren

Ependymom

Anaplastisches Ependymom

Myxopapilläres Ependymom

Subependymom

Tumoren des Plexus choroideus

Plexuspapillom

Plexuskarzinom

Neuronale und gemischt neuronalgliale Tumoren

Gangliozytom

Dysembryoplastischer neuroepithelialer Tumor

Gangliogliom

Anaplastisches Gangliogliom

Zentrales Neurozytom

Tumoren des Pinealisparenchyms

Pineozytom

Pineoblastom

Embryonale Tumoren

Medulloblastom

Primitiver neuroektodermaler Tumor (PNET)

Atypischer teratoider/rhabdoider Tumor des ZNS (ATRT)

1.3 Histologie und Molekularpathologie astrozytischer Tumoren

Um eine Vergleichbarkeit der verschiedenen astrozytischen Tumoren des Zentralnervensystems zu ermöglichen, wurde ein einheitliches Klassifizierungssystem festgelegt. Es basiert auf dem vierstufigen System von Daumas-Duport (Daumas-Duport et al., 1988). Das Klassifizierungssystem beurteilt die Histologie und die genetischen Alterationen des Tumors.

1.3.1 Histologie

Die histologische Beurteilung richtet sich nach der Zellzahl, dem Kern- und Zellpleomorphismus, den Mitosen/Mitosefiguren, der endothelialen Proliferation und den Nekrosen. In Tabelle 1 ist diese Klassifikation zusammengefasst. Tabelle 2 gibt die histopathologischen Kriterien der einzelnen Gliatumoren wieder.

Tab. 1: WHO-Klassifikation astrozytischer Tumoren nach Kleihues.

Tumor	WHO	Lebensalter	Dignität	Histologie	Genetische Alterationen
Pilozytisches Astrozytom	I	3-15	Benigne	bipolare, piloide Zellen, Rosenthal-Fasern, eosinophile Körperchen	Akkumulation von p53 (>50%), Deletion des Chromosoms 17q
Astrozytom	II	30-40	Niedergradig	Kernatypien	Mutation von p53 (>25%)
Anaplastisches Astrozytom	III	40-60	Maligne	Kernatypien, Mitosen	Mutation von p53 (>30%) und p16 (>20%), Deletion des Chromosoms 19q (<50%)
Glioblastoma multiforme	IV		Hochmaligne	Kernatypien, Mitosen, Nekrosen, Gefäßproliferationen	Mutation von p53 (>30%) und p16 (>50%), Deletion des Chromosoms 10 (>60%) und 19q (25%), EGFR Amplifikationen (>30%)

(Kleihues et al., 1993)

Tab. 2: Histopathologische Kriterien der Gliatumoren.

Gliatumoren		Alter	WHO °I	WHO °II	WHO °III	WHO °IV
			Histologie: keine Kriterien	Histologie: nukleäre Atypie	Histologie: nukleäre Atypie + Mitose	Histologie: nukleäre Atypie + Mitose + endo- theliale Proliferation -/+ Nekrosen
Astrozytäre Tumoren	Pilozytisches Astrozytom °I	3-15	+			
	Diffuses Astrozytom °II	30-40		+		
	Anaplastisches Astrozytom °III	40-60			+	
	Glioblastoma multiforme °IV	45-65				+
Oligodendro- gliome	Oligodendrogliom °II	35-50		+		
	Anaplastisches Oligodendrogliom °III	40-50			+	
Mischgliome	Oligoastrozytom °II	40-50		+		
	Anaplastisches Oligoastrozytom °III	40-50			+	

(Daumas-Duport et al., 1988)

1.3.2 Molekularpathologie

Das Konzept der Tumorprogression, d.h. die schrittweise Malignisierung neoplastischer Zellen, hat wesentlich zum Verständnis der Entstehung bösartiger Tumoren beigetragen (Kleihues et al., 1993). Das trifft in besonderer Weise auf die Tumoren der astroglialen Reihe zu, bei denen eine Progression von differenzierten, weniger malignen Tumoren bis hin zum hochmalignen Glioblastom beobachtet wird. Es hat sich gezeigt, dass unterschiedlich determinierte Wege zum Glioblastom führen (Lote et al., 1997, Kleihues et al., 2000). Glioblastome können sich entweder durch maligne Progression aus vorbestehenden niedriggradigen Gliomen entwickeln, oder sich de novo mit kurzer Anamnese manifestieren. Primäre und sekundäre Glioblastome können histologisch nicht von einander differenziert werden. Allerdings sind Patienten mit einem sekundären Glioblastom im Durchschnitt 10 bis 15 Jahre jünger, als Patienten mit einem primären Glioblastom. Weiterhin zeigen molekulargenetische Untersuchungen, dass sich die Häufigkeiten von genetischen Veränderungen zwischen primären und sekundären Glioblastomen deutlich

unterscheiden. Nachfolgend werden die molekulargenetischen Veränderungen in den astroglialen Tumoren aufgezeigt und ihre Bedeutung näher erläutert.

1.3.2.1 Das p53-Tumorsuppressorprotein

Das TP53-Tumorsuppressorgen auf dem Chromosom 17p13.1 kodiert für das Protein p53, das ein Molekulargewicht von 53 kDa hat. Dieses Protein ist in der Lage, Schäden an der DNA zu erkennen und den Zellzyklus zu blockieren. Das Protein ist in mehrere Domänen strukturiert und besteht aus einer Transaktivierungsdomäne im N-Terminus (AS 1-50, enthält MDM2-Bindungsstelle), einer Prolin-reichen Domäne (AS 63-97), einer DNA-Bindungsdomäne AS 102-292), einer Oligomerisierungsdomäne (AS 323-356) und einer C-terminalen Regulationsdomäne (AS 363-393). Die Domänen werden durch verschiedene Mechanismen posttranslationell modifiziert und übernehmen unterschiedliche Aufgaben (Wang et al., 2003). Wildtyp p53 wird in fast allen Geweben exprimiert und liegt in inaktivem Zustand vor (Giaccia et al., 1998). Es hat eine sehr geringe Halbwertszeit von nur 5 bis 20 Minuten, die über einen autoregulatorischen Rückkopplungseffekt garantiert wird. Dabei wird p53 von Proteinen wie dem MDM2 Proto-Onkogen gebunden, was zum Abbau des p53-Proteins führt. Durch die MDM2-Bindung werden Ubiquitylierungen initiiert, woraufhin p53 aus dem Zellkern transportiert und von Proteasen abgebaut wird (Tao et al., 1999).

DNA-Defekte, Hypoxien und Aktivierung von Onkogenen führen zu postrationalen Modifikationen am p53-Protein. Dadurch kommt es zu allosterischen Konformationsänderungen, die die Bildung von p53-Dimeren begünstigen (Cadwell et al., 2001). Die p53-Dimere schließen sich wiederum zu Tetramären zusammen und es kommt zu einer Erhöhung der Halbwertszeit von p53 mit einer bis zu 10-fachen Konzentrationserhöhung des Proteins im Nukleus (Pluquet et al., 2001). Weiterhin wird die sequenzspezifische DNA-Bindungsaktivität von p53 durch posttranslationelle Modifikationen stark erhöht. Durch DNA-Bindung in der Promoterregion von mehr als 300 Ziel Genen wird von p53 deren Expression induziert (Hall et al., 1996). Je nach Art und Ausmaß der Schädigung setzen Reparaturmechanismen oder Apoptoseinduktion ein (Mack et al., 1993).

In Säugetierzellen sind zwei Hauptwege der Apoptose definiert; der extrinsische und intrinsische Weg (Korsmeyer, 1999). Über den intrinsischen Weg fördert p53 die Expression von downstream Effektoren, wie BAX, PUMA und NOXA, was letztendlich die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien bewirkt. Die Interaktion von Cytochrom C mit Apaf-1 führt zur Aktivierung der Caspase 9 und nachfolgender Aktivierung der Caspase-Kaskade (Harris and Levine, 2005). Über den extrinsischen Signalweg aktiviert p53 an der Plasmamembran gelegene TNF-Rezeptoren, wie DR4, Killer/DR5 und Apo-1. Diese aktivieren über Caspase-8 ebenfalls die Caspase-Kaskade (Wu et al., 1997). Durch diese zwei Apoptose induzierenden Wege wird verhindert, dass veränderte, mutierte Zellen sich weiter teilen. Zellen mit Mutation des p53-Suppressorgens und dadurch inaktivem p53 verlieren die Fähigkeit, die Apoptose einzuleiten, teilen sich weiter und wachsen so zu Tumoren heran (Shapiro, 2002). Der Verlust der p53-Funktion tritt bei ca. einem Drittel aller Astrozytome auf.

1.3.2.2 MDM2-Gen

Das MDM2-Gen ist chromosomal lokalisiert auf 12q13-q15 und fungiert als positiver Regulator der Zellzyklusprogression durch Interaktion mit verschiedenen, Zellzyklus regulierenden Proteinen (Oliner et al., 1992). Das MDM2-Protein kann das Tumorsuppressorprotein p53 binden und dessen Aktivierungsdomäne blockieren. Durch die Blockade ist p53 nicht mehr in der Lage, als Transkriptionsfaktor zu fungieren. Somit stellt MDM2 einen zellulären Inhibitor der p53-Funktion dar. Gleichzeitig hemmt p53 durch Bindung an den MDM2-Promotor wiederum die Transkription von MDM2. Es besteht also eine autoregulatorische Schleife, wobei die Funktion von p53 durch MDM2 auf Proteinebene und die Expression von MDM2 durch p53 auf Transkriptionsebene reguliert werden (Barak et al., 1993). Das onkogene Potenzial von MDM2 konnte durch verschiedene Transfektionsexperimente belegt werden. Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von MDM2 zu einer verstärkten Tumorigenität in vitro führt (Fakharzadeh et al., 1991). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass MDM2 eine Transformation von neonatalen Astrozyten induzieren kann (Kondo et al., 1996) und eine durch p53 vermittelte Tumorsuppression antagonisieren kann (Finlay, 1993).

1.3.2.3 Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)

Das 110 kb große EGFR-Gen liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 7 (7q12) und kodiert für zwei wesentliche Transkripte von 10 kb und 5,6 kb. In glialen Zellen wird vornehmlich das 10-kb-Transkript exprimiert (Ekstrand et al., 1991). Bei dem EGFR-Genprodukt handelt es sich um ein glykosyliertes integrales Membranprotein mit einer extrazellulären Domäne, einer transmembranösen Domäne und einer intrazellulären Domäne. Die Aktivierung des EGF-Rezeptors erfolgt durch extrazelluläre Bindung eines spezifischen Liganden wie EGF oder TGF α . Nach Aktivierung des EGF-Rezeptors werden dessen Signale über Autophosphorylierung und die Rekrutierung von Signalmolekülen wie AKT ins Zellinnere geleitet. Dadurch wird das Zellwachstum stimuliert und der apoptotische Zelltod verhindert (Pawson und Saxton, 1999). Transformierende Eigenschaften kann der EGF-Rezeptor auf drei verschiedene Arten erhalten:

- Durch Deletion oder Mutation kann der EGFR um die extrazelluläre Domäne verkürzt werden. Das auf diese Weise entstandene verkürzte Rezeptorprotein ist auch ohne Bindung eines Liganden aktiviert (Ekstrand et al., 1994).
- Durch Mutation oder Deletion kann das mitogene Potenzial des Rezeptors erhöht werden und durch Unterbindung der Internalisierung des Rezeptor-Liganden-Komplexes zu neoplastischen Transformationen führen (Bulmer et al., 1989).
- Eine Überexpression des Rezeptors durch eines seiner Liganden kann ebenfalls eine EGFR-induzierte neoplastische Transformation zur Folge haben (Velu et al., 1987).

In primären Glioblastomen scheint der letztgenannte Mechanismus eine entscheidende Rolle zu spielen (Schlegel et al., 1994).

1.3.2.4 Phospholipid-Phosphatase Tumorsuppressorgen (PTEN)

Ein gehäuftes Auftreten von LOH im Bereich 10q23.3 des Chromosoms 10 bei einer Vielzahl von Tumoren führte zur Entdeckung von PTEN (Teng et al., 1997; Deimling et al., 1992; Deimling et al., 1994; Steck et al., 1997). PTEN ist ein weiteres Tumorsuppressorgen, das in Glioblastomen und anderen malignen Tumoren Mutationen aufweist. Es ist an der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt und

findet sich in 30 % bis 40 % der Glioblastome wieder (Boström et al., 1998). Eine Sequenzanalyse ergab, dass es sich bei dem von PTEN kodierten Enzym um eine Phosphatase handelt, die Lipide und Proteine zu phosphorylieren vermag. In phosphoryliertem Zustand unterstützen diese Phospholipide die Aktivität von AKT. AKT ist eine Serin/Threonin-Kinase, welche die Apoptose unterdrückt und die Zellteilung initiiert (Smith et al., 2000; Karlbom et al., 1993). Im Falle einer Schädigung des Gens entfällt diese inhibierende Wirkung auf das Zellwachstum, und es kommt zu unkontrollierter Zellvermehrung. Die Folge der gesteigerten AKT-Aktivität ist das Überleben der Zelle.

1.3.2.5 Das Retinoblastomgen (RB1)

Das Retinoblastomgen liegt auf dem Chromosom 13q14 und ist 200 kb groß. Das Genprodukt pRB1 ist ein nukleäres Phosphoprotein mit einem Molekulargewicht von 105000-110000 Dalton. Es ist von großer Bedeutung für die Regulation des Zellzyklus und der Kontrolle der Zelldifferenzierung. Die Funktion ist vom jeweiligen Phosphorylierungszustand abhängig.

Der Zellzyklus, der sich in Mitose und Interphase mit G1-, S- und G2-Phase unterteilt, wird von einem komplexen Netzwerk aus Zyklinen und Zyklin-abhängigen Kinasen, den CDKs, kontrolliert. Ihre sequentielle Expression und Aktivierung garantiert die Integrität und Identität proliferierender Zellen (Desai et al., 1995). In der G1-Phase bilden Zyklone und CDKs Kinase-Komplexe aus. Diese Kinase-Komplexe inaktivieren die Repressorfunktion des Retinoblastom-Proteins (RB). Die Aktivität des Zyklin/CDK-Komplexes wird wiederum von Zyklin-abhängigen Kinase-Inhibitoren (CKI), wie dem p21 gehemmt. p21 ist ein universeller CDK-Inhibitor. Durch p53 wird die p21-Genexpression transkriptionell stimuliert. Die Bindung von p21 an CDK2- und CDC2-Komplexe blockiert durch Inhibition der ATP-Bindung deren katalytische Aktivität. Das hat zur Folge, dass sowohl der Übergang der G1- zu S-Phase als auch der Eintritt von der G2-Phase in die Mitose unterbunden werden (Weinberg, 1995; Ohki et al., 2000).

1.4 Astrozytische Tumoren

Die astrozytischen Tumoren werden in zwei Gruppen unterteilt. Die erste Gruppe bilden das pilozytische Astrozytom, das pleomorphe Xanthoastrozytom und das subependymale Riesenzellastrozytom. Diese treten vorwiegend bei Kindern und jungen Erwachsenen auf und sind in der Regel durch ein abgegrenztes Wachstum gegenüber dem gesunden Hirngewebe gekennzeichnet. Sie haben eine gute Prognose und machen etwa 6 % aller intrakraniellen Tumoren aus. Zu der zweiten Gruppe gehören die infiltrierend wachsenden astrozytären Tumoren, wie das diffuse Astrozytom, das anaplastische Astrozytom und das Glioblastoma multiforme.

1.4.1 Diffuses Astrozytom WHO °II

Das diffuse Astrozytom zeigt ein hohes Maß an zellulärer Differenzierung, ist gekennzeichnet durch ein langsames Wachstum und durch eine diffuse Infiltration der angrenzenden Hirnstrukturen. Es hat eine Tendenz zur malignen Progression hin zum anaplastischen Astrozytom und zum Glioblastom. Betroffen sind typischerweise junge Erwachsene. Diffuse Astrozytome machen bis zu 5 % der hirneigenen Tumoren und 10 % bis 15 % der astrozytären Gliome aus. Ihre bevorzugte Lokalisation sind die Großhirnhemisphären. Da funktionell wichtige Areale betroffen sein können, ist eine komplette Entfernung oft nicht möglich.

Die häufigste zytogenetische Veränderung ist ein Gewinn von Chromosom 7q (Trisomie 7). Diese Veränderung wurde in 50 % aller Astrozytome nachgewiesen (Bigner et al., 1990; Schröck et al., 1996). Neben chromosomalen Gewinnen wurden auch Allelverluste auf 13q, 17p und 22q nachgewiesen (Ueki et al., 1996). Mehr als die Hälfte der Astrozytome zeigen Verluste auf 17p. In der Mehrheit dieser Fälle konnte eine Mutation im verbliebenen Allel des TP53-Gens nachgewiesen werden (Collins et al., 1993; Bögler et al., 1995). Immunhistochemische Untersuchungen von p53 zeigen, dass es in Astrozytomen häufig zu einer Proteinakkumulation kommt, die jedoch nicht zwingend mit einer Genmutation korrelieren muss (Bögler et al., 1995). Astrozytome mit akkumuliertem p53, aber ohne Mutation, zeigen häufig eine verstärkte Expression des Apoptose-Inhibitors Bcl-2 (B-cell CLL/Lymphoma 2) (Alderson et al., 1995). Weiterhin konnte eine Expression von

PDGFR- α mit Allelverlusten auf 17p positiv korreliert werden (Hermanson et al., 1996).

1.4.2 Anaplastisches Astrozytom WHO °III

Anaplastische Astrozytome können primär auftreten oder aus einem niedriggradigen Astrozytom entstehen. Sie machen 10 % bis 15 % der astrozytären Gliome aus. Die Tumorlokalisation beim Erwachsenen ist meist die Großhirnhemisphäre. Tumoren im Kindesalter befallen oft den Hirnstamm. Aufgrund der Lokalisation in funktionell wichtigen Arealen ist häufig eine komplette Entfernung nicht möglich.

Das anaplastische Astrozytom zeigt eine erhöhte Proliferationstendenz. Es finden sich fokale oder generalisierte Zeichen der Anaplasie, wie z. B. mikrovaskuläre Prolifere. Die erhöhte mitotische Aktivität dient hier als Hauptkriterium zur Abgrenzung gegenüber dem diffusen Astrozytom WHO °II. Durch Operation und Bestrahlung können bei anaplastischen Gliomen (WHO °III) Überlebenszeiten von 27 bis 36 Monaten erreicht werden.

Neben den in Tabelle 1 beschriebenen Veränderungen weisen die anaplastischen Astrozytome molekulargenetische Veränderungen mit zusätzlichen Allelverlusten auf 9p, 11p und 19q auf (Fults et al., 1992; Sonoda et al., 1995; Weber et al., 1996; Schmidt et al., 1994). Das auf 9p21 gelegene Tumorsuppressorgen CDKN2A kodiert für den CDK4- und CDK6-Inhibitor p16 und ist in ca. 20 % der anaplastischen Astrozytome homozygot und in 28 % hemizygot deletiert. In 15 % der anaplastischen Astrozytome konnte eine Amplifikation und Überexpression von CDK4 nachgewiesen werden (Ichimura et al., 1996; Schmidt et al., 1994). In Tumoren, die keine Veränderungen in CDKN2A oder CDK4 zeigten, wurden gehäuft Allelverluste auf 13q gefunden, die mit Mutationen des RB1-Tumorsuppressorgens einhergingen (Ichimura et al., 1996; Ueki et al., 1996). In 40 % der Tumoren konnten Veränderungen der Gene CDKN2A, CDK4 und RB1 nachgewiesen werden, deren Produkte miteinander interagieren und bei der Zellzykluskontrolle eine wesentliche Rolle spielen. Bei der Entwicklung eines anaplastischen Astrozytoms scheint dem Übergang der G1- zur S-Phase der Zellprogression eine entscheidende Bedeutung zuzukommen. Weitere

Amplifikationen in anaplastischen Astrozytomen finden sich im MDM2-Gen (8 % bis 10 %) und im EGFR-Gen (<10 %) (Collins, 1995).

1.4.3 Oligodendrogliom WHO °II und anaplastisches Oligodendrogliom WHO °III

Die Oligodendrogliome bilden eine Untergruppe der glialen Tumoren und treten mit einer Inzidenz von 5 % bis 10 % aller Gliome auf. Das Inzidenzmaximum liegt in der fünften und sechsten Dekade mit einer medianen Altersverteilung von 43 Jahren (Kaba et al., 1996). Oligodendrogliome sind histologisch durch ein Honigwabemuster gekennzeichnet. Mikroverkalkungen und ein Netzwerk aus dünnwandigen zarten und oft wenig verzweigten Tumorgefäßen sind weitere typische Merkmale dieser Tumoren. Oligodendrogliome wachsen bevorzugt in der weißen Substanz und im Kortex der Großhirnhemisphäre, wobei das Frontalhirn in 50 % bis 60 % der Fälle betroffen ist. Sie werden mindestens als WHO °II eingestuft. Eine erhöhte mitotische Aktivität und das Vorliegen von mikrovaskulären Proliferationen und/oder Nekrosen sind kennzeichnend für anaplastische Oligodendrogliome WHO °III. Oligodendrogliome sind relativ chemosensitive Tumoren. Ihre Prognose ist deutlich besser als die der rein astrozytären Tumoren gleichen Malignitätsgrads. Wesentliches Unterscheidungsmerkmal der oligodendroglialen Tumoren, in Abgrenzung von den Astrozytomen, ist der Nachweis von Verkalkungen in der Computertomographie bei 70 % bis 90 % der Patienten (Cairncross et al., 1985; Abrey et al., 2003).

1.4.4 Glioblastoma multiforme

1.4.4.1 Epidemiologie

Die Inzidenz maligner Gliome wird mit etwa 11 Fällen auf 100.000 Einwohner und Jahr angegeben, wobei sie mit zunehmendem Lebensalter steigt (Radhakrishnan et al., 1995). Das entspricht ungefähr 2 % aller Krebserkrankungen. Unter den verschiedenen Tumorarten des Nervensystems machen Gliome ungefähr 40 % der Fälle aus. Das Glioblastoma multiforme gehört zu den astrozytären Tumoren und zeigt eine erhöhte Inzidenz beim männlichen Geschlecht (Mahaley et al., 1989). Es

tritt hauptsächlich zwischen dem 45. und 70. Lebensjahr auf. Es werden primäre und sekundäre Glioblastome unterschieden. Die primäre Form entsteht de novo, die sekundäre Form aus einem vorbestehenden niedriggradigen Gliom. Ungefähr 10 % der Glioblastome überschreiten durch Infiltration des Corpus callosum die Mittellinie. Diese werden aufgrund ihrer symmetrischen Lokalisation auch als Schmetterlingsgliome bezeichnet. Die Ausbreitung der Tumorzellen erfolgt durch Modulation der umliegenden extrazellulären Matrix. Die Migration von Tumorzellen wird durch Sekretion verschiedener Proteasen, insbesondere von Metalloproteasen, die eine lysierende Wirkung auf extrazelluläre Proteine haben, ermöglicht. Weiterhin sind die Tumorzellen in der Lage, Inhibitoren dieser Proteasen zu sezernieren, wodurch sie eine Umgebung erzeugen, in der Wachstum und Stase von ihnen kontrolliert werden (Uhm et al., 1997).

1.4.4.2 Ätiologie

Die Ätiologie der Gliome des Menschen ist noch weitgehend unklar. In verschiedenen epidemiologischen Studien zeigen sich Hinweise auf einen möglichen Einfluss bestimmter beruflicher und außerberuflicher Expositionen, Ernährungs- und Lebensgewohnheiten sowie vorangegangener traumatischer oder entzündlicher Ereignisse (Wrensch et al., 2002; Ohgaki und Kleihues, 2005). Ein eindeutiger Beweis dieser exogenen Noxen auf die Entstehung von Hirntumoren beim Menschen konnten bisher nicht erbracht werden. Eine Ausnahme stellt die therapeutische Röntgenbestrahlung des Schädels dar. Bei Kindern, die im Rahmen einer Akuten Lymphatischen Leukämie zur Prophylaxe einer leptomeningealen Tumoraussaat bestrahlt wurden, zeigt sich ein statistisch signifikant erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Glioms als Zweittumor (Neglia et al., 1991).

1.4.4.3 Molekularpathologie

Die Glioblastome sind durch komplexe Veränderungen des Karyotyps mit multiplen, numerischen und strukturellen Chromosomenaberrationen charakterisiert (Muleris et al., 1994; Schröck et al., 1994; Kim et al., 1995a; Mohapatra et al., 1995). Etwa 40 % der Glioblastome zeigen eine homozygote Deletion des CDKN2A-Gens auf 9p21 (Schmidt et al., 1994; Ueki et al., 1996; Ichimura et al., 1996). Ungefähr ein Drittel

der Glioblastome zeigt einen Verlust von 13q und damit einhergehende Deletionen oder Mutationen des RB1-Gens (James et al., 1988; Ueki et al., 1996; Ichimura et al., 1996). In einer weiteren Subgruppe von ca. 15 % der Glioblastome ist das CDK4-Gen auf 12q14 amplifiziert und überexprimiert (Ueki et al., 1996; Ichimura et al., 1996). Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass in den Tumoren Veränderungen vorliegen, die die Zellzykluskontrolle beim Übergang von der G₁- zur S-Phase einschränken. Die Tumorzellen können nicht mehr in den G₁-Arrest übergehen, was letztendlich eine unkontrollierte Proliferation zur Folge hat. In 30 % der Glioblastome finden sich Allelverluste auf 17p und Mutationen des dort lokalisierten TP53-Gens (Reifenberger et al., 1996; Watanabe et al., 1996). Der Verlust des Chromosoms 10 ist in 60 % bis 70 % nachweisbar, wobei in ca. 30 % bis 40 % der Fälle Mutationen im PTEN Tumorsuppressorgen vorliegen (Li et al., 1997; Mollenhauer et al., 1997).

Genetische Veränderungen in Glioblastomen betreffen nicht nur Genverluste bzw. Mutationen von Tumorsuppressorgen, sondern auch Amplifikationen von verschiedenen Protoonkogenen. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass in Glioblastomen das EGFR das am häufigsten amplifizierte und überexprimierte zelluläre Onkogen ist (Collins, 1995). Zusätzlich zum EGFR exprimieren diese Tumoren gleichzeitig seine wichtigsten Liganden TGF α und/oder EGF (Ekstrand et al., 1991). In 50 % der Tumoren mit EGFR-Amplifikation liegt eine so genannte Typ-III-Deletion des Gens vor, die konsekutiv in einem aktiven Rezeptormolekül resultiert (Sugawa et al., 1990; Ekstrand et al., 1994; Nishikawa et al., 1994). Eine MDM2-Amplifikation und Überexpression findet sich nur in Tumoren mit intaktem TP53 (Reifenberger et al., 1993). In 15 % der Glioblastome zeigen sich Amplifikationen von Genen in der Region 12q13-q15, CDK4 und MDM2 (Reifenberger et al., 1994a; Reifenberger et al., 1996a). Diese Marker sind in Abbildung 1 zusammengefasst.

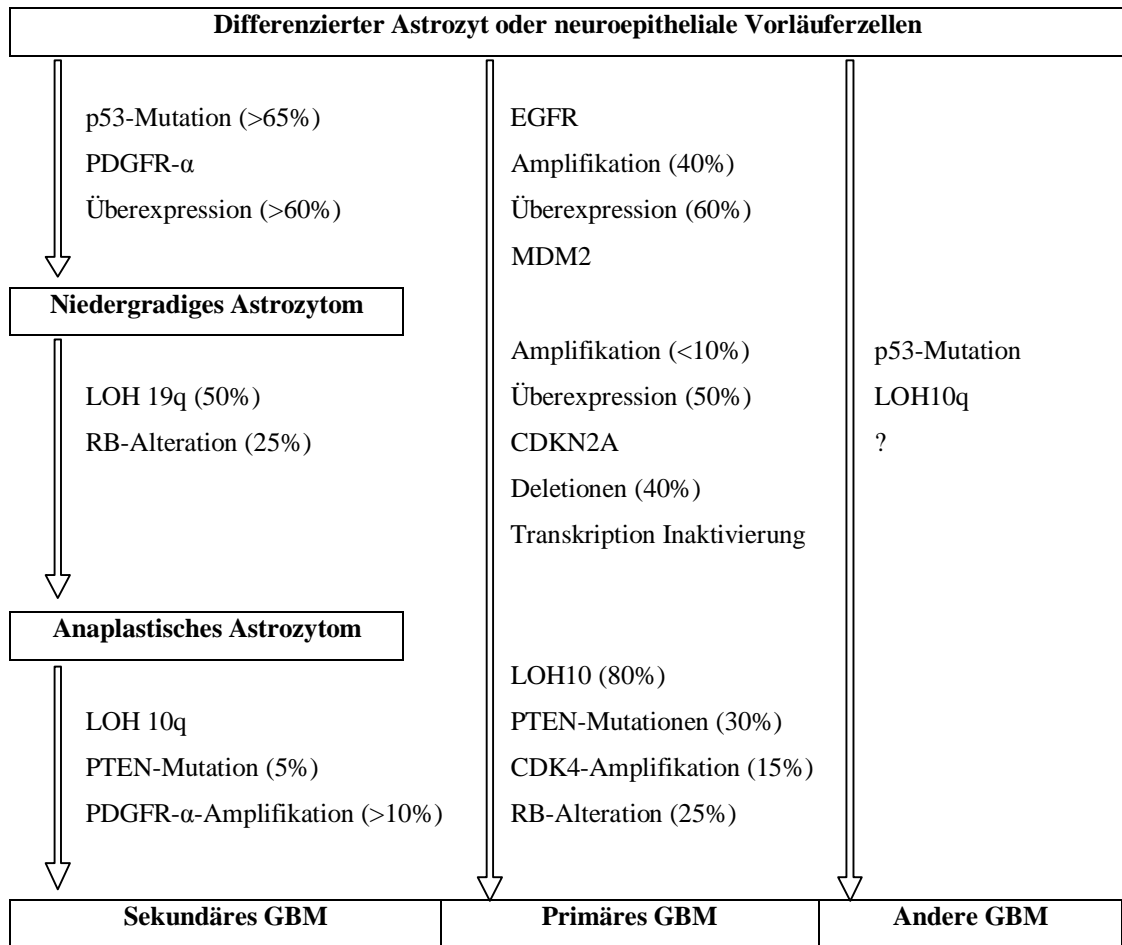


Abb. 1: Molekulargenetische Veränderungen in diffusen astrozytären Gliomen und Glioblastomen.

Die molekulopathologischen Veränderungen unterscheiden sich in primären und sekundären Glioblastomen. Primäre Glioblastome zeigen in nur 25 % bis 30 % eine Mutation des TP53-Gens (70 % bis 80 % bei sekundären Glioblastomen) und weisen wesentlich häufiger eine Amplifikation und Überexpression der Gene EGFR, MDM2, MDM4, sowie eine Mutation des PTEN-Gens auf (Watanabe et al., 1996). Weiterhin wurden in primären Glioblastomen häufiger homozygote CDKN2A-Deletionen gefunden (Reyes-Mugica et al., 1997; Biernat et al., 1997). Allelverluste auf 19q und 13q, Promotorhypermethylierung des RB1-Gens und Überexpression von PDGFR- α treten bei primären Glioblastomen seltener als in sekundären Glioblastomen auf (Reifenberger et al., 1996; Watanabe et al., 1996; Kleihues et al., 1999; Nakamura et al., 2000). Primäre und sekundäre Glioblastome tragen somit unterschiedliche genetische Veränderungen, deren funktionelle Konsequenzen jedoch dieselben Signalwege betreffen. Abbildung 2 gibt eine Übersicht über die bei

der Initiation und Progression von diffusen astrozytären Gliomen zum Glioblastom WHO °IV involvierten molekulargenetischen Veränderungen.

Diffuses Astrozytom WHO °II	Anaplastisches Astrozytom WHO °III	Glioblastom WHO °IV
<i>Veränderung der p53 vermittelten Kontrolle von Apoptose, Zellzyklusprogression und DANN Reparatur</i>		
TP53 Mutation p14 ^{ARF} Hypermethylierung	TP53 Mutation p14 ^{ARF} Hypermethylierung/ homozygote Deletion	TP53 Mutation p14 ^{ARF} homozygote Deletion MDM2 Amplifikation MDM4 Amplifikation
<i>Aktivierung der Signaltransduktion von Wachstumsrezeptoren</i>		
PDGFRα Überexpression	PDGFRα Überexpression	EGFR Amplifikation PDGFRα Amplifikation MET Amplifikation
<i>Veränderung der pRB1 abhängigen Zykluskontrolle</i>		
CDKN2A/CDK2B homozygote Deletion RB1 Mutation CDK4/CDK6 Amplifikation		
<i>Aktivierung des Phosphoinositol-3-kinase/ Proteinkinase B Signalwegs</i>		
PTEN Mutation EGFR Amplifikation PDGFRα Amplifikation		

Abb. 2: Schematische Darstellung der bei der Initiation und Progression von diffusen astrozytären Gliomen involvierten molekulargenetischen Veränderungen. Zunächst kommt es durch TP53- oder p14^{ARF}-Inaktivierung zum Verlust der p53-abhängigen Wachstumskontrolle. Häufig zeigen diese Tumoren zusätzlich eine Überexpression von PDGFα und seinem Rezeptor PDGFRα, was zu einer Aktivierung der Proteinkinasekaskade führt. In anaplastischen Astrozytomen wird zusätzlich ein Funktionsverlust der pRB1-abhängigen Zellzykluskontrolle gefunden, verursacht durch Inaktivierung der Genprodukte von CDKN2A, CDKN2B, RB1, CDK4 oder CDK6. Die Glioblastome zeigen Alterationen des Phosphoinositol-3-Kinase/Proteinkinase-B-Signalwegs, die durch verschiedene genetische Veränderungen, wie z.B. PTEN-Mutation, sowie Amplifikationen und Überexpressionen von Wachstumsfaktoren, ausgelöst werden können.

1.4.4.4 Makroskopisches Bild

Das makroskopische Bild eines Glioblastoms ist charakterisiert durch Bezirke mit und ohne Nekrosen oder Hämorrhagien. In vivo Studien an Nacktmäusen zeigten, dass Tumorzellen ein massives und irreguläres Gefäßwachstum induzieren, das den Bedarf der Tumorzellen an Sauerstoff und Nährstoffen zunächst deckt, bei zunehmendem Wachstum jedoch überfordert und dadurch die zentralen Nekrosen verursacht (Vajkoczy et al., 1998). Zysten und Verkalkungen können ebenfalls auftreten (Abbildung 3A und 3B).



Abb. 3: A: Koronarer Schnitt durch ein pathologisches Präparat des Gehirns. Links im Temporallappen liegt ein Glioblastom mit erkennbaren Verkalkungen (Pfeil). Zentral im Tumor sind Nekrosen zu sehen. B: Transversaler Schnitt durch ein pathologisches Präparat des Gehirns. Rechts im Bereich der Stammganglien liegt ein Glioblastom. Die schwarze Fläche stellt eine Blutung dar (Pfeil). Zentral im Tumor sind ebenfalls Nekrosen zu sehen.

(Institut für Neuropathologie, HHU Düsseldorf, 2004)

1.4.4.5 Histologisches Bild

Das histologische Bild ist charakterisiert durch eine ausgeprägte Zell- und Gewebepolymorphie mit strichförmigen und flächenhaften Tumorgewebsnekrosen, girlandenförmigen Gefäßproliferationen sowie durch eine diffuse Infiltration des angrenzenden Hirnparenchyms (Daumas-Duport et al., 1988). Dieses irreguläre Bild hat den Begriff „multiforme“ geprägt (Abbildung 4). Weiterhin ist das Glioblastom infiltrativ wachsend, zellreich und teilungsaktiv.

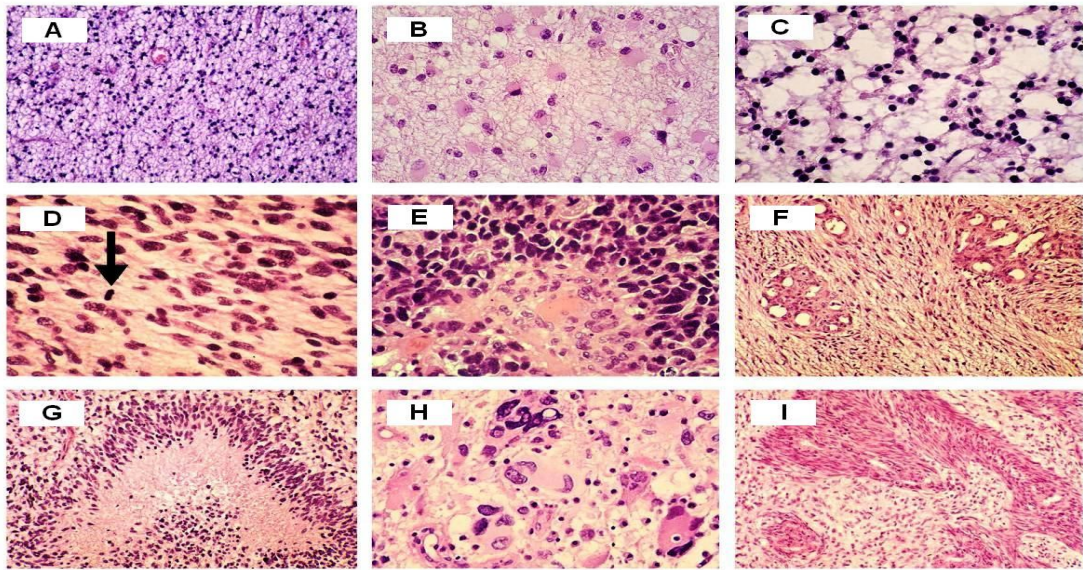


Abb. 4: HE gefärbte Histologieschnitte der diffusen Astrozytome WHO °II und °III und des Glioblastoma multiforme WHO °IV. A-C: Histologie der diffusen Astrozytome WHO °II. Dargestellt sind typische Beispiele eines fibrillären (A), eines gemizytotischen (B) und eines protoplasmatischen (C) Astrozytoms. D: Anaplastisches Astrozytom WHO °III mit erhöhter Zelldichte, nukleärer Pleomorphie und mitotischer Aktivität (Pfeil). E: Sehr zellreiches Glioblastom WHO °IV mit mitotischer Aktivität und pathologischen Tumorgefäßen. F: Pathologische mikrovaskuläre Prolifere mit glomerulumartigen Kapillaren in einem Glioblastom. G: Nekrose mit pseudopalisadenartiger Anordnung der Tumorzellen in einem Glioblastom WHO °IV. H: Riesenzell-Glioblastom WHO °IV mit zahlreichen multinukleären Riesenzellen. I: Gliosarkom WHO °IV mit biphasischem Muster, das durch gliale und sarkomatöse Tumorbereiche entsteht.

(Institut für Neuropathologie, HHU Düsseldorf, 2004)

1.4.4.6 Klinische Symptomatik

Eine spezifische klinische Symptomatik existiert für das Glioblastom nicht. Eine charakteristische Frühsymptomatik fehlt ebenfalls. Die Entwicklung des primären Glioblastoms vollzieht sich meist innerhalb von zwei bis vier Monaten (Kleihues et al., 1995; Scott et al., 1998). Oft zeigen die Patienten einen Leistungsknick, der von Wesens- und Stimmungsveränderungen begleitet sein kann. Diese Symptome können sehr subtil sein und nur den Patienten selbst oder ihrer unmittelbaren Umgebung auffallen. Diese ersten Anzeichen werden oft als Ausdruck einer psychischen

Belastung oder einer beginnenden Depression fehl gedeutet. Bei ca. 30 % der Patienten ist das Erstsymptom der Kopfschmerz (Pfund et al., 1999). Der Kopfschmerz entwickelt sich dabei meist langsam über Wochen und Monate und ist nur selten permanent vorhanden. Je nach Lokalisation des Tumors können auch epileptische Anfälle, Hemiparesen, Seh- und Sprachstörungen auftreten. Die genannten Symptome sind Anlass für neurologische und bildgebende Untersuchungen, die schließlich zur Diagnose führen.

1.4.4.7 Bildgebende Diagnostik

1973 führte Hounsfield die Computertomographie ein. Damit änderte sich die neuroradiologische Diagnostik. Diese Technik ermöglichte erstmals die direkte Darstellung des intrakraniellen Tumors, war nicht invasiv und nahezu beliebig wiederholbar. Einige Jahre später wurde die Magnetresonanztomographie eingeführt. Durch diese Technik wurde die Diagnose intrakranieller Prozesse weiter verbessert (Lauterbur, 1980). Verglichen mit der Computertomographie stellt das MRT die anatomischen Strukturen viel genauer dar. Selbst kleinere oder niedrigmaligne Veränderungen können vom gesunden Hirngewebe abgegrenzt werden (Bragg und Osborn, 1991; Jaeckle, 1991; Byrne, 1994).

In Abbildung 5 ist das MRT eines Patienten mit einem Glioblastom links parietooccipital in unterschiedlichen Wichtungen dargestellt. Auf T1-gewichteten MRT-Aufnahmen stellen sich maligne Astrozytome in der Regel hypointens dar (Abbildung 5 A). Nach Gabe von Gd-DTPA als Kontrastmittel zeigt sich im Tumorgewebe eine heterogene und serpentinartige Anreicherung. Während die intakte Blut-Hirn-Schranke für Gd-DTPA undurchlässig ist, erhöht sich im Zuge der Neovaskularisation des Tumors die Permeabilität für das Kontrastmittel. Die Kontrastierung ist damit ein indirekter Indikator für die Tumorangiogenese. Das Ödem, das den Tumor umgibt, zeigt ein hypointenses Signal. Ebenso ist eine vollständig solide Kontrastmittelanreicherung in der Läsion möglich (Abbildung 5 B) (Jolesz et al., 1993). Die FLAIR-Wichtung stellt das im Gewebe befindliche Ödem weiß dar (Abbildung 5 C).

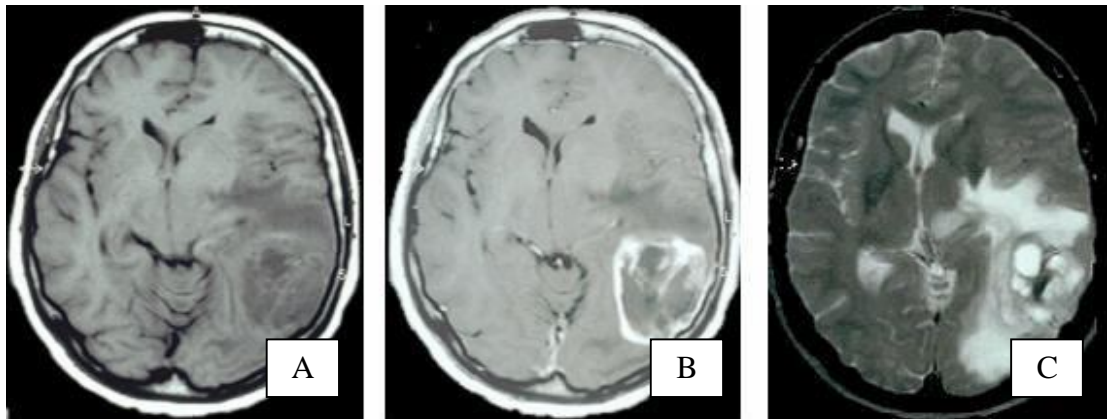


Abb. 5: MRT-Aufnahmen des Schädels eines Patienten mit einem Glioblastoma multiforme links parietooccipital in der gleichen Schnittebene und in verschiedenen Wichtungen. A: T1-Wichtung, transversal; B: T1-Wichtung mit Kontrastmittel, transversal; C: FLAIR-Wichtung, transversal.

Eine spezielle Anwendung des MRT ist die MR-Spektroskopie (MRS), die Einblicke in den Gewebstoffwechsel erlaubt. Bei der MRS werden aus dem MR-Signal spezifische Resonanzfrequenzen von bestimmten Protonen herausgelesen, die sich durch deren Bindung an verschiedene Metabolite ergeben. Die MRS erfasst die Metabolite N-Acetylaspartat (NAA, Marker für die zelluläre Integrität der Neurone), Cholin (Cho, Marker für die Membransynthese), Creatin (Cr, Metabolit des Energiestoffwechsels), Lactat (Metabolit des Glucosestoffwechsels) und Lipide. In malignen Gliomen finden sich einerseits erhöhte Peaks für Lactat, Cholin und Lipide, andererseits erniedrigte NAA-Spiegel. Das erhöhte Lactat ist dabei als Ausdruck des gesteigerten Glucosestoffwechsels, das Cholin als Ausdruck der gesteigerten Proliferationsaktivität und die Lipide als Ausdruck des Membranuntergangs zu sehen. Der niedrige Peak für NAA dagegen steht für den Entdifferenzierungsgrad (Tschampa, 2003). Die MRS hat für die Diagnose zerebraler Gliome keine Bedeutung, liefert jedoch zusätzliche Informationen zur Differentialdiagnose, zur Planung einer Biopsie und in der Rezidivdiagnostik (Dowling et al., 2001; McKnight et al., 2002; Law et al., 2003).

Durch die Positronenemissionstomographie (PET), bei der die Aktivitätsverteilung eines in den Körper injizierten, Positronen abstrahlenden Radionuklids aufgezeichnet wird, wurde die quantitative Darstellung biologischer Vorgänge möglich. Das am häufigsten verwendete Radionuklid in der PET ist das radioaktive Isotop der

Fluordesoxyglucose (FDG), das mit Hilfe eines Zyklotrons hergestellt wird. Eine Hydroxylgruppe des FDG wird dabei durch das Radionuklid ^{18}F ersetzt. Das ^{18}F -FDG wird von Zellen wie Glucose aufgenommen und zum Endprodukt ^{18}F -FDG-6-phosphat verstoffwechselt, das schließlich in den Zellen akkumuliert. Die Verteilung von ^{18}F -FDG erlaubt somit Rückschlüsse auf den Glucosestoffwechsel verschiedener Gewebe im Körper. Da Tumorzellen aufgrund eines erhöhten Stoffwechsels viel Glucose benötigen, akkumuliert dort das ^{18}F -FDG.

Die PET kommt bei der Differenzierung von Rest- bzw. Rezidivtumoren und Strahlennekrosen zum Einsatz. Hier ist sie der CCT und der MRT überlegen. Strahlennekrosen zeigen sich auf den Aufnahmen meist hypometabolisch, während sich Rest- bzw. Rezidivtumoren hypermetabolisch darstellen (Barker et al., 1997; Kaschten et al., 1998; Goldmann et al., 1996). Während die PET mit ^{18}F -FDG eine wichtige Bedeutung bei der Diagnostik hochmaligner Tumoren hat, können niedrig-maligne Prozesse durch den relativ hohen physiologischen Glucosestoffwechsel des Gehirns maskiert sein. Beim Einsatz des neuen Radiopharmakons ^{18}F -FET (Fluor-Ethyl-Tyrosin) -PET wird dagegen der Aminosäurestoffwechsel der Gewebe gemessen. Da Tumoren einen etwa vierfach höheren Aminosäureumsatz zeigen, lassen sie sich vom restlichen Gehirngewebe abgrenzen. Die Aufnahme der Aminosäuren ^{18}F -FET in Tumorzellen ist dabei stereospezifisch. Sie wird durch transmembranöse Aminosäuretransporter vermittelt. ^{18}F -FET wird nach Aufnahme in die Zelle nicht im Rahmen der Proteinbiosynthese zum Aufbau von Proteinen herangezogen, sondern mit einer Latenz wieder in den Extrazellularraum freigesetzt (Langen, 2003; Heiss, 1999). Das ^{18}F -FET-PET stellt somit eine geeignete Untersuchungsmethode dar, um höhergradige Areale in Low-Grade Gliomen darzustellen und diese gezielt zu biopsieren.

Abbildung 6 stellt die Kernspintomographie und das ^{18}F -FET-PET eines Patienten mit einem bioptisch gesicherten Low-grade Gliom im Verlauf dar. In den ursprünglichen Bildern (Bild A und B) zeigt das MRT nur eine kleine, kaum erkennbare, fleckige Veränderung im Hirngewebe, die im ^{18}F -FET-PET jedoch schon deutlich die Aminosäure ^{18}F -FET aufnimmt (Pfeil). In den Kontrollbildern nach nur 2 Monaten (Bild A1 und B1) hat sich ein großes Glioblastom WHO °IV mit typischer ringförmiger Kontrastmittelaufnahme, zentraler Nekrose und umgebendem Hirnödem entwickelt.

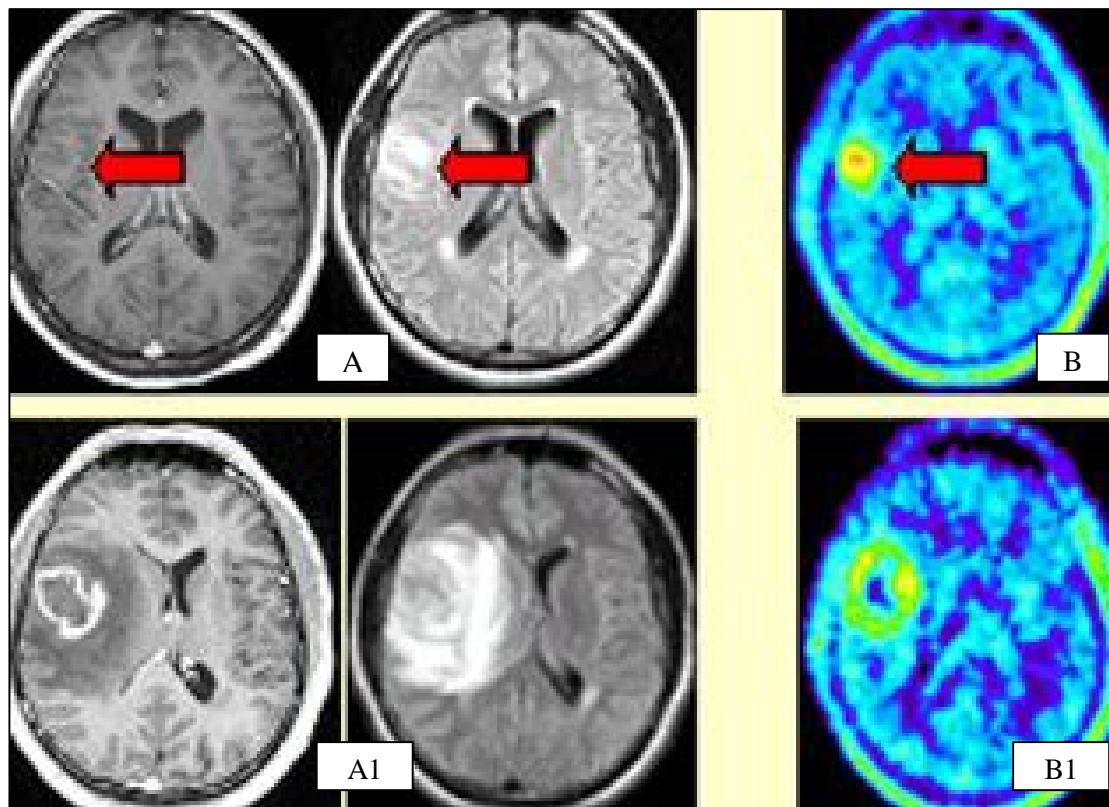


Abb. 6: Kernspintomogramm des Schädels (A) und Aminosäure-PET mit ^{18}F -FET (B) im Verlauf bei einem Patienten mit einem histologisch nachgewiesenen niedriggradigen Gliom WHO °II im rechten Parietallappen. Die untere Reihe mit den Abbildungen A1 und B1 zeigt die Kontrollaufnahmen nach zwei Monaten.

Eine weitere Methode der bildgebenden Diagnostik ist die Single-Photon-Emissionstomographie (SPECT). Mit diesem Verfahren ist es ebenfalls möglich, die Perfusion im Tumorgewebe zu messen und abzubilden.

Bei Tumorlokalisationen in eloquenten Arealen ist das funktionelle MRT von zentraler Bedeutung. Sie stellt eine Möglichkeit dar, funktionelle Zusammenhänge biologischer Strukturen darzustellen. Hierbei macht man sich die unterschiedlichen magnetischen Eigenschaften von oxygeniertem und desoxygeniertem Blut, die sich kernspintomographisch durch das BOLD-Signal (Blood Oxygen Level Dependency) erfassen lassen, zu nutze (Pauling, 1935). Mittels des BOLD-Signals ist es möglich, millimetergenau begrenzte Aktivitätsschwankungen des Gehirns zu messen, die mit der Verarbeitung sensorischer oder mentaler Aktivität einhergehen. Steigt die durchschnittliche Impulszahl und damit die elektrochemische Aktivität der Gehirnzellen eines Hirnareals an, so steigt auch ihr Bedarf an Sauerstoff und

Glukose. Dadurch kommt es in den aktivierten Hirnarealen zu Änderungen des Blutflusses, der vorhandenen Blutmenge sowie der Sauerstoffsättigung des Blutes. Diese ziehen Veränderungen des lokalen Magnetfelds nach sich, die sich bei der Verwendung geeigneter MRT-Sequenzen im BOLD-Signal widerspiegeln (Ogawa et al., 1990; Logothetis et al., 2001).

Bisher war es nicht möglich, eine Verbindung zwischen 2D-Bildern und dem Operationsfeld herzustellen. Diese Lücke schließt die Neuronavigation. Mit Hilfe der Neuronavigation ist es möglich, während einer neurochirurgischen Operation die Position der Instrumente im Inneren des Schädels anzuzeigen. Die Instrumente werden dazu während der Operation mit einer Infrarotkamera verfolgt und in Schnittbildern oder einer dreidimensionalen Darstellungen eingeblendet, die vor der Operation mit Röntgentechnik (CT, MRT) aufgenommen wurden. Die Neuronavigation wird genutzt, um Operationen zu planen und um sich während der Operation im Inneren des Schädels besser orientieren zu können. Sie kommt zum Einsatz beim Auffinden tief liegender oder kleiner Läsionen (z.B. Cavernome, Hirnstammläsionen, Schädelbasistumoren, Metastasen, Ventrikeltumoren) und bei Läsionen in eloquenten Arealen.

Die Katheterangiographie wird nur noch in Ausnahmefällen zur präoperativen Abklärung der Gefäßversorgung oder zur Gefäßembolisation durchgeführt. Typische angiographische Befunde bei Glioblastomen sind retikuläre, korkenzieherartig gewundene Gefäßproliferationen und arteriovenöse Shunts.

Die kraniale Kernspintomographie in Verbindung mit einem Kontrastmittel gilt heute als das Basisverfahren zur Diagnosestellung von Hirntumoren. Mit Hilfe dieser Methode ist eine ausreichende Darstellung der Raumforderung und damit eine Operationsplanung möglich.

1.4.4.8 Therapie

Die Therapie von Glioblastomen basiert auf 1. Operation, 2. Radiatio und 3. Chemotherapie. Wenn eine OP-mikroskopische Totalresektion auf Grund der Lokalisation oder Zugänglichkeit des Tumors nicht möglich ist, wird eine Volumenreduktion angestrebt. Das Minimalziel ist die histologische Sicherung, die z.B. auch durch eine stereotaktische Biopsie erfolgen kann. Die Behandlung umfasst

weiterhin die Strahlen- und die Chemotherapie. Neben der symptomatischen palliativen Therapie werden zahlreiche experimentelle Therapieansätze untersucht. Der Krankheitsverlauf des Glioblastoma multiforme wird von folgenden prognostischen Faktoren beeinflusst:

- Alter des Patienten
- Initialer Karnofski-Index
- Malignitätsgrad
- Ausmaß der Tumorresektion
- Chemotherapie / Strahlentherapie

Das Alter, der Karnofski-Index und der Malignitätsgrad gelten als klassische Prognosefaktoren. Einen positiven Einfluss auf die lokale Tumorkontrolle und auf die Überlebenszeit nach Diagnosestellung haben die therapeutischen Verfahren Operation, Strahlen- und Chemotherapie. Als prognostisch günstig gilt ein Alter von unter 60 Jahren bei Diagnosestellung mit signifikant längeren Überlebenszeiten bei jüngeren Patienten (Schackert, 1998). Günstig wird der Krankheitsverlauf im Hinblick auf das Überleben auch von einem guten Allgemeinzustand beeinflusst. Hier fungiert der Karnofski-Index als Maß. Als einer der wichtigsten Faktoren gilt der Malignitätsgrad nach der WHO Klassifikation (Tabelle 3).

Tab. 3: Überlebensraten 2 und 5 Jahre nach Diagnose eines primären Hirntumors.

	Häufigkeit (%) der hirneigenen Hirntumoren)	Inzidenz pro 100.000 Einwohner pro Jahr	Mittleres Alter bei Diagnose	2-Jahres- Überleben (%)	5-Jahres- Überleben (%)
Diffuses Astrozytom	1,3	0,17	47	67	49
Oligodendrogliom	2,6	0,32	41	80	63
Anaplastisches Astrozytom	4,3	0,54	50	46	31
Anaplastisches Oligodendrogliom	0,6	0,07	46	61	38
Glioblastom	22,6	2,94	62	9	3

(Davis et al., 1999)

1.4.4.8.1 Operative Therapie

Mehrere prospektive und retrospektive Studien zeigen, dass das Ausmaß der Resektion von Glioblastomen kein signifikanter prognostischer Faktor ist (Coffey et al., 1988; Kreth et al., 1994; Simpson et al., 1993). Andere Studien belegen dagegen, dass eine mikrochirurgisch komplette Resektion die Überlebenszeit verlängern kann (Shapiro et al., 1989; Winger et al., 1989). Es gibt keine randomisierte Studie, die den Effekt einer Tumorresektion verschiedenen Ausmaßes direkt miteinander vergleicht. In einer prospektiven randomisierten Studie an 334 Patienten mit einem malignen Gliom wurde bei kompletter Tumorresektion eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit, verglichen mit allen anderen chirurgischen Therapieansätzen festgestellt (Dinapoli et al., 1993). Eine retrospektive Analyse von 263 Patienten mit einem Glioblastom zeigte einen signifikanten Überlebenszeitvorteil nach totaler Tumorresektion gegenüber einer Biopsie (51 vs 33 Wochen) (Devaux et al., 1993). Ähnliche Schlussfolgerungen konnten aus den Ergebnissen der Analyse von 285 Patienten mit einem malignen Astrozytom gezogen werden. Die Patienten lebten nach kompletter Resektion länger als nach subtotaler Resektion und länger als nach einer Biopsie (Winger et al., 1989). Die Daten von drei prospektiven Studien mit insgesamt 645 Patienten mit einem Glioblastom stützen diese Ergebnisse. Die mittlere Überlebenszeit betrug nach kompletter Resektion 11,3 Monate, nach partieller Resektion 10,4 Monate und nach einer Biopsie 6,6 Monate (Simpson et al., 1993). In einer prospektiven Studie an 30 Patienten, die älter als 65 Jahre waren und ein malignes Gliom hatten, zeigte sich eine mediane Überlebenszeit von 171 Tagen nach Tumorresektion und Bestrahlung vs. 85 Tagen nach stereotaktischer Biopsie und Bestrahlung (Vuorinen et al., 2003). In einer multizentrischen Erhebung an 788 Patienten mit einem malignen Gliom (anaplastisches Astrozytom, Glioblastom) zeigte sich, dass die Resektion statt Biopsie, ein Alter unter 60 Jahren und ein Karnofski-Index über 70 % mit einer längeren Überlebenszeit verbunden war (Laws et al., 2003).

Als großer Fortschritt in der Therapie maligner Gliome ist die Einführung der Resektionskontrolle mittels 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) zu werten. Bei dieser Methode wird dem Patienten vier Stunden vor dem geplanten operativen Eingriff gewichtsadaptiert oral 5-ALA verabreicht. 5-ALA ist ein Metabolit der Hämbiosynthese. Sie wird mit Hilfe der 5-ALA-Synthase aus Succinyl-CoA und

Glycin gebildet. Im Rahmen des weiteren Syntheseweges entsteht das unter violettblauem Licht stark rot-fluoreszierende, lipophile Protoporphyrin IX (PPIX). Die zentrale Positionierung des Fe^{2+} -Atoms in PPIX erfolgt durch die mitochondriale Ferrochelatase und schließt die Hämbiosynthese ab. Das am Ende der Stoffwechselkette entstehende Hämmolekül hemmt durch eine negative Rückkopplung die endogene Synthese von 5-ALA. Da die meisten kernhaltigen Zellen für die oxydative Phosphorylierung im Rahmen ihres Stoffwechsels hämhaltige Enzyme zum Elektronentransport verwenden, wird davon ausgegangen, dass diese Zellen eine gewisse Kapazität zur Produktion von PPIX besitzen. Durch exogene Zufuhr von hohen 5-ALA-Konzentrationen kann nun die Hemmung dieses Stoffwechselweges durch Häm umgangen und eine erhöhte Produktion von PPIX induziert werden (Kennedy et al., 1992). Da die Weitermetabolisierung von PPIX zu Häm durch die begrenzte Aktivität der Ferrochelatase den geschwindigkeitsbegrenzenden Schritt darstellt, tritt eine Akkumulation von PPIX ein (Peng et al., 1997). PPIX ist durch seine Fähigkeit zur intensiven Fluoreszenz gekennzeichnet. Das Absorptionsmaximum liegt dabei bei 400 nm. Die Fluoreszenzemission liegt im roten Spektralbereich (Emissionsmaxima bei 635 nm und 700 nm).

Diese intensive Fluoreszenzeigenschaft macht man sich bei der Tumorresektion zur Nutze. Über ein Fluoreszenzmikroskop wird der Tumor visualisiert und kann so zum gesunden Hirngewebe besser abgegrenzt und reseziert werden (Abbildung 7). Eine multizentrische randomisierte Phase III Studie an 372 Patienten zeigte, dass nach Anwendung von 5-ALA 65 % der Kontrastmittel anreichernden Tumoren vollständig entfernt wurden, während es in der Kontrollgruppe nur 36 % waren. Die Patienten in der 5-ALA Gruppe hatten ein höheres 6-Monate-progressionsfreies Überleben als die Kontrollgruppe (41 % vs. 21,1 %) (Stummer et al., 2006). Folglich ist die möglichst vollständige mikrochirurgische Tumorresektion unter Schonung des umliegenden Gewebes die adäquate Behandlung.

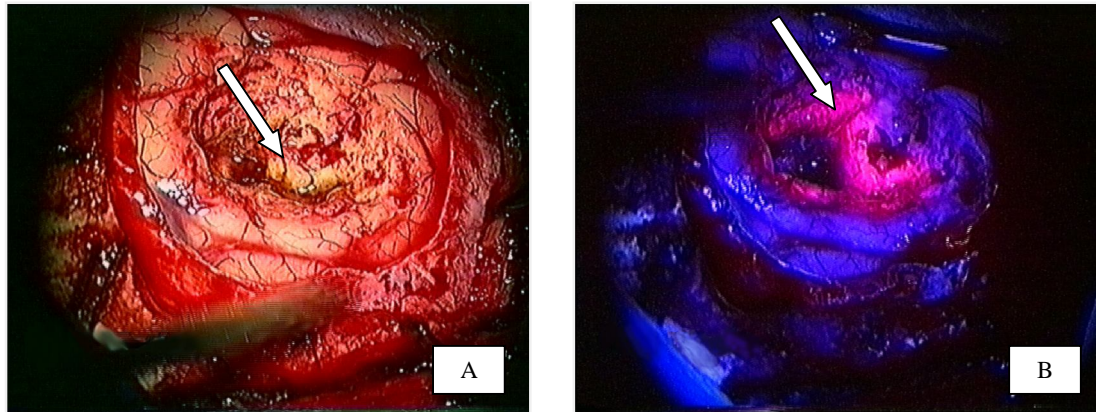


Abb. 7: Vergleich der Darstellung einer Resektion eines malignen Glioms im Operationsmikroskop unter Weißlicht (A) und unter Fluoreszenzanregung (B). Die Abbildungen zeigen den eröffneten Kortex mit darunterliegendem, malignem Gliom, erkennbar an der bräunlichen, zentralen Nekrose (Pfeil). Unter Weißlicht lässt sich der Tumor schwer abgrenzen. Unter der Fluoreszenzanregung zeigt der randständige Tumor eine deutliche Rotfluoreszenz (Pfeil), während die Nekrose keine Fluoreszenzakkumulation erkennen lässt. Das normale Hirngewebe zeigt keine Fluoreszenzakkumulation.

Da sich ca. 3 Tage nach der Operation von Läsionen im Gehirn unspezifische Blut-Hirn-Schrankenstörungen entwickeln können, die von Tumorresten nicht sicher unterscheidbar sind, und diese Veränderungen unterschiedlich lange persistieren können, wird zur Beurteilung eines Resttumors ein frühes postoperatives MRT innerhalb von 24 bis max. 72 Stunden angefertigt. Eine unmittelbare Untersuchung nach der Operation ist nicht sinnvoll, weil durch Gefäßeröffnung während der Operation unspezifische Kontrastmittelaustritte eine tumorbedingte Kontrastmittelaufnahme vortäuschen können (Albert et al., 1994; Cairncross et al., 1985; Forsting et al., 1993; Forsyth et al., 1997; Warmuth-Metz, 2003). Zum einen wird durch diese Untersuchung die Vollständigkeit der Tumorresektion untersucht, zum anderen dient sie als Baseline für Verlaufskontrollen und zur Beurteilung von Tumorrezidiven. Bei einem lokalen Tumorrezidiv in nicht eloquenten Hirnarealen kann im Rahmen einer zweiten Operation eine Nachresektion durchgeführt werden. Bei Tumoren, die operativ aufgrund ihrer Lokalisation nicht entfernt werden können, ist der weitere Verlauf von der Strahlen- und Chemotherapie abhängig.

1.4.4.8.2 Strahlentherapie

Aufgrund ihres infiltrativen Wachstums ist bei Glioblastomen selbst nach totaler Resektion mit einem Rezidivtumor zu rechnen. In den späten 70er Jahren konnte die Wirksamkeit der Ganzhirnbestrahlung zur Therapie maligner Astrozytome nachgewiesen werden. Studien zeigten einen Zusammenhang zwischen der Dosis der Ganzhirnbestrahlung und der Überlebenszeit bei Patienten mit Glioblastomen. Eine Ganzhirnbestrahlung mit einer Dosis von 50, 55 bzw. 60 Gy führte zu einer mittleren Überlebenszeit von 28, 36 und 42 Wochen (Walker et al., 1980). Allerdings ist nach Ganzhirnbestrahlung in ca. 5 % der Fälle nach Ablauf eines Jahres mit Hirnfunktionseinschränkungen zu rechnen (Sheline, 1977). Als weitere mögliche Spätkomplikationen werden Gefäßverengungen, Strahlennekrosen und Zweittumoren beschrieben (Leibel und Sheline, 1987; Shapiro, 1989). Die Ganzhirnbestrahlung wird nur noch selten bei Gliomen durchgeführt.

Mehr als 90 % der Rezidive maligner Gliome entstehen im Bereich der ursprünglichen Tumorregion (Choucair et al., 1986; Wallner et al., 1989). Diese Erkenntnisse führten zu der Entwicklung der fokalen Strahlenbehandlung, bei der die Strahlendosis auf das Tumorbett und eine Sicherheitszone appliziert wird. Sie stellt heute die Standardtherapie in der Behandlung von Patienten mit malignen Gliomen dar (Choucair et al., 1986). Eine retrospektive Untersuchung an 91 Patienten mit einem Glioblastom, die stereotaktisch biopsiert und anschließend bestrahlt wurden, zeigte, dass diejenigen Patienten, die eine adäquate Strahlendosis von 60 Gy erhielten, im Median 8 Wochen länger lebten, als die Patienten, die weniger als 50 bis 60 Gy Strahlendosis erhielten (Coffey et al., 1988).

Die Planung der Radiatio erfolgt auf der Basis von 3D-Schnittbilddatensätzen (CCT, MRT). Hier wird das Zielvolumen exakt definiert und auf jedem einzelnen Bild der Schnittbilduntersuchung eingezeichnet. Basierend auf den Ergebnissen von Coffey erfolgt die Bestrahlung percutan mit einer Gesamtstrahlendosis von 60 Gy. Dabei wird über einen Zeitraum von sechs Wochen mit 5 x 2,0 Gy pro Woche bestrahlt. Die Standardtherapie beinhaltet heute eine postoperative Nachbestrahlung mit gleichzeitiger Temodal-Gabe (Stupp et al., 2005). Ziel dieser Therapie ist es, die verbliebenen tumorösen Zellen möglichst langfristig im Wachstum zu hemmen.

1.4.4.8.3 Chemotherapie

Einen weiteren Therapieansatz bei Patienten mit Glioblastomen stellt die Chemotherapie dar. Sie wird zum einen als adjuvante Therapie eingesetzt. Zum anderen findet sie Anwendung bei fortgeschrittener Tumorausdehnung, die einer neurochirurgischen Therapie nicht mehr zugänglich ist (Buckner et al., 1994). Im Gegensatz zur Chemotherapie peripherer Organe wird die medikamentöse Therapie intrakranieller Tumoren durch verschiedene spezifische Probleme erschwert: Die Blut-Hirn-Schranke verhindert die Aufnahme vieler Pharmaka in das Zentralnervensystem. Diese Schranke wird von der Mehrzahl der Tumoren geschädigt und wird somit für Pharmaka durchlässig. Die Schrankenstörung ist jedoch inhomogen, so dass eine gleichmäßige Anflutung des Chemotherapeutikums im Tumor nicht gewährleistet ist. Ein weiteres Problem der Chemotherapie ist die Minderperfusion von Tumorgewebe, verglichen mit normalem Hirngewebe.

Verschiedene Zytostatika kamen bisher in der Chemotherapie von astrozytären Tumoren zum Einsatz. Zu diesen gehören die Nitrosoharnstoffe ACNU (Nimustin), BCNU (Carmustin) und CCNU (Lomustin), das Procarbacin, die Topoisomerase II Hemmer Etoposid (VP 16) und Teniposid (VM 26), das Vincaalkaloid Vincristin, das Imidazonderivat Temozolomid und die Platinderivate Cisplatin und Carboplatin. Im Rahmen der NOA-01-Studie (Neuroonkologische Arbeitsgemeinschaft der Deutschen Krebsgesellschaft) wurde nach abgeschlossener Bestrahlung die Wirkung von ACNU plus VM 26 oder ACNU plus Cytarabin bei neu diagnostiziertem Glioblastom verglichen. Hier lag die mediane Überlebenszeit bei Patienten mit einem Karnofski-Index über 60 nach einer Radio- plus Chemotherapie im Median bei 17,3 Monaten (Weller et al., 2003). In einer weiteren Studie wurde die interstitielle Chemotherapie mit BCNU-Wafer (Gliadel) zusätzlich zur Strahlentherapie untersucht. Die Ergebnisse zeigten bei malignen Gliomen einen Anstieg der medianen Überlebenszeit von 11,6 auf 13,9 Monate (Westphal et al., 2003).

In einer Phase-II-Studie konnte für die Kombination Temozolomid zusätzlich zur Radiotherapie bei neu diagnostizierten Glioblastomen eine gute Durchführbarkeit, eine gute Verträglichkeit und eine beachtliche Wirksamkeit aufgezeigt werden (Stupp et al., 2002). Diese Studie war die Grundlage für eine randomisierte Phase-III-Studie, in der die Rolle einer zusätzlichen Chemotherapie zur bisherigen

Standardtherapie (Radiotherapie) nach Operation oder Biopsie bei neu diagnostizierten Glioblastomen untersucht werden sollte. Dabei wurde die alkylierende Substanz Temozolomid zusätzlich zur Radiotherapie mit alleiniger Radiotherapie verglichen. Patienten zwischen 18 bis 70 Jahren mit einem neu diagnostizierten Glioblastom wurden nach der Operation (oder Biopsie) in die beiden Studienarme randomisiert. Der primäre Endpunkt war das Gesamtüberleben. Die sekundären Endpunkte waren das progressionsfreie Überleben, die Lebensqualität, die Sicherheit und Tolerabilität der Therapie und eine Gesundheitskostenanalyse. Die mittlere Beobachtungsdauer betrug 28 Monate. Innerhalb von sechs Wochen nach Operation eines Glioblastoms wurden die Patienten im Standardarm über sechs Wochen täglich mit 60 Gy in 2 Gy Fraktionen während 5 Tagen pro Woche bestrahlt. Die Patienten im experimentellen Studienarm erhielten zusätzlich während der gesamten Bestrahlungszeit Temozolamid in einer Dosierung von 75 mg/m². Nach Abschluss der Radiotherapie und einer vierwöchigen Pause wurde die Chemotherapie an fünf Tagen pro Monat in einer Dosierung von 150-200 mg/m² Körperoberfläche für weitere sechs Monate fortgesetzt. Es wurden 573 Patienten in 85 Zentren randomisiert. 286 Patienten erhielten nur Radiotherapie, 287 erhielten Temozolomid zusätzlich zur Radiotherapie, gefolgt von 6 Monaten Temozolomid. Das mediane Alter betrug 56 Jahre. Das mediane Überleben für die Kombination Radiotherapie plus Chemotherapie betrug 14,6 Monate und für Radiotherapie alleine 12,1 Monate. Das 2-Jahres-Überleben lag bei 26,5 % in der Kombinationsbehandlung und bei 10,4 % im Radiotherapie-Mono-Arm. Patienten auf dem Radiotherapie-Mono-Arm hatten die Möglichkeit, bei Tumorprogression ebenfalls von der Chemotherapie mit Temozolomid zu profitieren. Der späte Einsatz von Chemotherapie (erst beim Rezidiv) konnte aber die besseren Resultate einer up-front Therapie nicht mehr aufholen. Weiterhin zeigte diese Studie auch interessante molekulargenetische Resultate.

Die Analyse des Tumorgewebes ergab einen Überlebensvorteil für Patienten mit einem inaktivierten (methylierten) MGMT-Gen unabhängig von der Behandlungsart (Stupp et al., 2005). Neuere Untersuchungen belegen die Existenz von resistenten Tumoren, wie z.B. eine Zellpopulation, die aufgrund der fehlenden Methylierung der Promotor-Region des O-(6)-Methylguanin-DNA-Methyltransferase-Gens (MGMT) das MGMT-Genprodukt bildet. Das MGMT ist ein Reparaturenzym, das durch

alkylierende Chemotherapeutika verursachte DNA-Schäden reparieren kann. Bilden die Tumorzellen viel MGMT, so können viele Schäden repariert werden, und die Therapie ist weniger erfolgversprechend. Wird dagegen wenig MGMT gebildet, so ist ein besseres Ansprechen der Patienten auf die Chemotherapie zu beobachten (Tanaka et al., 2001). Es wurde in einer Begleituntersuchung zur EORTC-Studie (Temozolomid plus Strahlentherapie vs. Strahlentherapie allein) festgestellt, dass vor allem Patienten mit Glioblastomen, die eine Methylierung des O-(6)-Methylguanin-DNA-Methyltransferase-Promotors aufweisen, von der zusätzlichen Chemotherapie mit Temozolomid profitieren (Hegi et al., 2005).

1.4.4.8.3.1 PCV-Polychemotherapie

Unter der Polychemotherapie allgemein versteht man die Kombination verschiedener Chemotherapeutika. Es werden meist zellzyklusunabhängige mit zellzyklusabhängigen Zytostatika kombiniert. Durch die Kombination verschiedener Zytostatika mit unterschiedlichen Nebenwirkungen wird die Verträglichkeit verbessert und die Entstehung sekundär resistenter Zellen vermindert. Die PCV-Polychemotherapie ist eine Kombination aus Procarbazin, CCNU und Vincristin.

Procarbazin ist eine alkylierende Substanz, deren Wirkmechanismus im Einzelnen nicht geklärt ist. Es liegt in Tablettenform vor, wird nach oraler Gabe gut resorbiert und penetriert aufgrund seiner Lipophilie die Blut-Hirn-Schranke. CCNU ist ein Nitrosoharnstoff, der oral in Kapselform verabreicht wird und aufgrund seiner Lipophilie ebenfalls die Blut-Hirn-Schranke passiert. Vincristin ist ein Mitosespindelgift, das die Zellteilung in der Metaphase der Mitose stoppt. Es ist hydrophil und wird parenteral verabreicht.

Ein PCV-Zyklus besteht aus 29 Tagen. Nach Tag 29 folgt eine vierwöchige Pause vor dem nächsten Zyklus. Der nächste Zyklus wird erst begonnen, wenn die Leukozyten über 3000/ μ l und die Thrombozyten über 100000/ μ l liegen.

1. Tag

- Ondansetron 4 mg oral oder i.v.
- CCNU 110 mg/m² Körperoberfläche



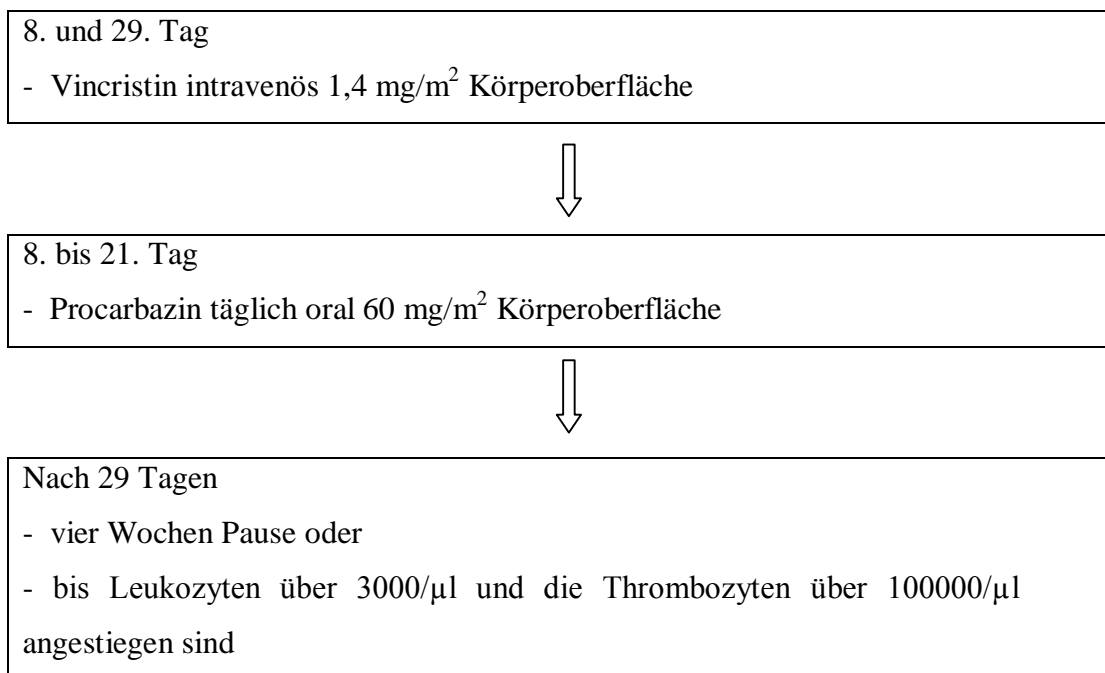


Abb. 8: PCV-Zyklus

Nebenwirkungen der PCV-Chemotherapie

Procarbazin: Eine häufig beobachtete Nebenwirkung von Procarbazin ist die verzögerte Myelosuppression. Akute reversible gastrointestinale Beschwerden in Form von Anorexie, Übelkeit und Erbrechen werden ebenfalls häufig beobachtet. Gelegentlich kommt es zu allergischen Reaktionen mit makulopapillärem Exanthem, Hypereosinophilie oder Fieber. Seltene Nebenwirkungen sind anaphylaktischer Schock, toxische epidermale Nekrolyse oder Stevens-Johnson-Syndrom. Auch pulmonale Veränderungen im Sinne einer interstitiellen Pneumonitis können auftreten. Hinweise auf Neurotoxizität äußern sich in Somnolenz, Depression, Verwirrtheit, Unruhe, Halluzinationen oder Parästhesien der Extremitäten und sind ebenfalls, wie der Haarausfall, reversibel. In Kombination mit anderen Alkylanzien kommt es bei etwa 90 % der Männer zu irreversiblen Azoospermien und bei etwa 50 % der Frauen zu einem permanenten Sistieren der Ovarialfunktion. Mit einer Latenzperiode von 3-5 Jahren kann es zu Zweitneoplasien kommen.

CCNU: Nach Applikation von CCNU kommt es zu einer verzögerten Myelosuppression mit Leukozyten- und Thrombozytenabfall 3 bis 6 Wochen nach der Applikation. Weitere Nebenwirkungen sind Übelkeit, Erbrechen, Diarrhö,

Dermatitis, Stomatitis, Haarausfall, Hyperurikämie, Leberschäden, Nierenschäden und Schäden der ableitenden Harnwege, Störungen der Spermatogenese und der Ovulation und neurotoxische Störungen. Bei kumulativen Dosen über 1100 mg/m^2 Körperoberfläche besteht die Gefahr von Lungenfibrosen.

Vincristin: Bei Verabreichung von Vincristin wird nur selten eine Myelosuppression beobachtet. Eine wichtige Nebenwirkung stellt die sensomotorische und autonome Polyneuropathie dar. Weitere Nebenwirkungen sind Übelkeit, Erbrechen, Diarrhö, Stomatitis, Hyperurikämie, Störungen der Spermatogenese und der Ovulation sowie Intimareizungen. Selten kommt es zu Überempfindlichkeitsreaktionen in Form von Hautreaktionen oder Angioödem, Fieber, Depressionen, Psychosen, Kopfschmerzen, Hypertonie, Gewichtsverlust oder Hyponatriämie.

1.4.4.8.3.2 Temozolomid-Therapie

Temozolomid ist ein Imidazontetrazinderivat, das Quervernetzungen der DNA bewirkt und vor allem an der O⁶-Position des Guanins alkyliert. Es wird nach oraler Gabe gut resorbiert und penetriert aufgrund seiner Lipophilie sehr gut die Blut-Hirn-Schranke. Temozolomid ist in Kapseln à 5 mg, 20 mg, 100 mg und 250 mg erhältlich.

Temozolomid wird an den ersten 5 Tagen eines Zyklus in einer Dosis von 200 mg/m^2 Körperoberfläche gegeben. Ein Zyklus besteht aus 28 Tagen. Vor oder zu der Temozolomid-Gabe werden oral 4 mg des Antiemetikums Ondansetron appliziert. Vor jedem Zyklus werden Blutbild, Differentialblutbild, Elektrolyte, Retentionswerte (Kreatinin, Harnstoff), Leberenzyme (SGOT, SGPT) sowie AP und γ -GT kontrolliert. Der nächste Zyklus wird begonnen, wenn die Leukozyten über $3000/\mu\text{l}$ und die Thrombozyten über $100000/\mu\text{l}$ liegen. Die Bestimmung von Leukozyten, Thrombozyten und Hämoglobin wird am 21. Tag des jeden Zyklus wiederholt.

1. Tag bis 5. Tag

- Ondansetron oral 4 mg

- Temozolamid oral 200 mg/m^2 Körperoberfläche



Nach 28 Tagen

- Beginn des nächsten Zyklus am 29. Tag oder
- wenn Leukozyten über 3000/ μ l und die Thrombozyten über 100000/ μ l liegen

Abb. 9: Temozolomid-Zyklus

Nebenwirkungen der Temozolomid-Therapie

An häufigen Nebenwirkungen werden Kopfschmerzen (41 %), Übelkeit (53 %) und Erbrechen (42 %) angegeben. Bei weniger als 10 % der Patienten mit Übelkeit und Erbrechen ist eine antiemetische Therapie notwendig. Weitere Nebenwirkungen sind Müdigkeit (34 %), Obstipation (33 %), abdominale Schmerzen (9 %), Diarrhö (16 %) und Anorexie (9 %). Verzögerte Myelosuppression mit Ausbildung einer Anämie (4 %), Leukopenie (11 %), Neutropenie (14 %) und Thrombozytopenie (19 %) werden vor allem bei älteren weiblichen Patienten beobachtet. Weniger als 10 % der Patienten im Zelltief durch Myelosuppression müssen zur Bluttransfusion hospitalisiert werden. Infektionen und Fieber werden in weniger als 13 % der Fälle beobachtet. Wenn sich Infektionen entwickeln, betreffen diese überwiegend die Atemwege (Pharyngitis 8 %, Sinusitis 6 %, Infekte der unteren Atemwege 8 %, Husten 5 %) oder die Harnwege (8 %) (Stupp et al., 2005; Brada et al., 2001). Weiterhin gibt es seltene Berichte über atypische *Pneumocystis carinii* Pneumonien (Yu et al., 2007).

1.5 Pathophysiologie von Hirntumoren

1.5.1 Blut-Hirn-Schranke

Die Blut-Hirn-Schranke ist eine physiologische Barriere zwischen dem Blutkreislauf und dem Zentralnervensystem, das im ZNS zur Erhaltung der Homöostase dient. Die Durchlässigkeit von Hirnkapillaren ist durch die Blut-Hirn-Schranke diffizil geregelt. Sie reguliert den Übertritt von Substanzen in das ZNS und stellt für hydrophile Makromoleküle eine Permeationssperre dar. Lipophile Substanzen können dagegen nahezu vollständig durch Diffusion aus dem Blut entzogen werden. Diese Barriere wird über sogenannte „tight junctions“ erreicht. „Tight junctions“ bestehen aus

einem Netzwerk schmaler Stränge, die von spezialisierten Membranproteinen gebildet werden. Die extrazellulären Domänen dieser Membranproteine verbinden sich und bilden damit eine Zellverbindung. Sie umgeben gürtelartig den gesamten Zellumfang und bilden auf diese Weise im Epithelzellverband eine zusammenhängende Diffusionsbarriere, die den parazellulären Transport von Molekülen über das Epithel verhindert bzw. kontrolliert. Weiterhin verhindern sie die freie Bewegung von Membrankomponenten und erhalten dadurch die Polarität der Epithelzellen indem sie sie in apikale und basale Bereiche unterteilen.

Die Blut-Hirn-Schranke stellt ebenfalls eine Barriere für Chemotherapeutika dar, die über den Blutweg anströmen. Sofern für diese Substanzen keine speziellen Carrier vorhanden sind, ist die Überwindung der Barriere vor allem von ihrer Lipophilie abhängig (Brandes und Foirentino, 1996; Joliet-Riant und Tillement, 1999). Schädigungen am Hirngewebe führen über die Aktivierung eines komplexen zellulären Systems zu einem Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke. Zerebrale Endothelzellen besitzen Rezeptoren für die Nukleotide ATP (Adenosintriphosphat), UTP (Uridintriphosphat) und ADP (Adenosindiphosphat). Eine Aktivierung dieser Nukleotid-Rezeptoren führt zu einer Steigerung der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke (Abbott, 1991; Abbott, 2000).

1.5.2 Entstehung des Hirnödems

Das Gehirn reagiert auf eine Vielzahl von Störungen mit einem Ödem. Dies können Hirninfarkte, schwere Schädel-Hirn-Traumen aber auch Hirntumoren sein. Das Ödem kann ein erhebliches Ausmaß erreichen. Es wird angenommen, dass es durch eine Störung der Blut-Hirn-Schrankenfunktion zu einem Ausstrom von proteinreicher und plasmaartiger Flüssigkeit aus den Gefäßen ins Hirnparenchym kommt (Schlegel und Westphal, 1998). Es werden das zytotoxische und das vasogene Ödem unterschieden. Das zytotoxische Ödem betrifft sowohl die graue als auch die weiße Hirnsubstanz und ist durch den Ausfall aktiver Transportmechanismen bedingt. Das Ödem kann innerhalb von Sekunden oder Minuten nach einem Gefäßverschluss entstehen und ist für den Fall einer sofortigen Rezirkulation des ischämischen Bereiches reversibel. Bei diesem Prozess bleibt die Kapillarpermeabilität unverändert (Abbott, 2000).

Das zytotoxische Hirnödem beruht auf einer toxischen Schädigung des Zellmetabolismus und der damit einhergehenden Dysfunktion der in der glialen, neuronalen und endothelialen Membran lokalisierten Na^+/K^+ -ATPase durch Zellgifte wie Zyanid oder Kohlenmonoxid. Diese Funktionsstörung tritt in Abhängigkeit von der Schwere des Primärschadens und der Begleitumstände (Hypoxie, Schockzustand, Hypoglykämie, usw.) auf. Sie führt neben einer vermehrten intrazellulären Na^+ - und Wasserretention zu einer extrazellulären Akkumulation von Kalium (Katayama et al., 1990). Es kommt zu einer Zellschwellung durch Zusammenbruch der Ionengradienten und Flüssigkeitseinstrom vom extra- in den intrazellulären Raum. Eine primäre Schädigung der Blut-Hirn-Schranke lässt sich nicht nachweisen.

Kommt es innerhalb von Stunden oder Tagen nicht zu einer Reperfusion des ischämischen Bereiches oder ist die Reperfusion nur unzureichend, bildet sich ein vasogenes Ödem. Es entsteht durch eine primäre Schädigung der Blut-Hirn-Schranke in der Umgebung von Herdprozessen (perifokales Ödem) wie Hirntumoren, Verletzungsherden, Massenblutungen und entzündlichen Läsionen. Das vasogene Ödem entwickelt sich in drei Phasen: Phase der Exsudation, Phase der Ausbreitung und Phase der Auflösung. Bedingt durch eine Aufweitung der interendothelialen „tight junctions“ kommt es in der exudativen Phase zu einer, durch die fokale Läsion hervorgerufene, Permeabilitätssteigerung der Kapillarendothelien. Durch den bestehenden hydrostatischen Druck und dem daraus resultierenden Druckgradienten kommt es zum Übertritt eines proteinreichen, plasmaähnlichen Filtrates in den zerebralen Extrazellularraum. Die Flüssigkeit breitet sich vornehmlich in der weißen Substanz aus, da die parallel angeordneten Bahnen der weißen Substanz weniger Widerstand bieten, als der vergleichsweise kompakte und zellreiche Kortex. Durch das Ödem kommt es zu einer Kompression der Hirngefäße, der intrakranielle Druck steigt an und führt zu einer Druckschädigung von Hirngewebe und Hirnnerven (Schilling und Wahl, 1997; Stummer, 2007). Eine operative Entfernung der fokalen Schädigung führt unverzüglich zu einer Abnahme des Ödems (Samdani et al., 1997). Mediatoren des Hirnödems sind VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), Stickstoffmonoxid und Arachidonsäuremetaboliten (Imaizumi et al., 1996; Yasuma et al., 1997; Schilling und Wahl, 1999; Unterberg et al., 1997).

VEGF ist ein Zytokin, das ursprünglich als vaskulärer Permeabilitätsfaktor beschrieben wurde. Weiterhin ist es in die Angiogenese involviert (Senger et al., 1983). Darüber hinaus scheinen VEGF in die Tumorgenese, die Neovaskularisation und die Ödementstehung involviert zu sein (Machein und Plate, 2000). VEGF bindet über die Tyrosin-Kinase-Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 an Endothelzellen. Diese Rezeptoren werden überwiegend von den Endothelzellen exprimiert. VEGF bewirkt durch die Rezeptorenbindung eine Steigerung der Permeabilität an den Endothelzellen und ist in seiner ödemsteigernden Wirkung rund tausend Mal stärker als Histamin (Connolly, 1991; Criscuolo, 1993). Weiterhin besteht ein Zusammenhang zwischen der VEGF Expression und dem Malignitätsgrad von Gliomen. Low grade Gliome exprimieren niedrige Konzentrationen von VEGF. Bei einer sekundären Malignisierung der Low grade Gliome zum Glioblastoma multiforme kommt es zu einem bis zu 50-fachen Anstieg der VEGF mRNA Konzentrationen (Plate et al., 1992). Auch Arachidonsäuremetaboliten haben eine permeabilitätssteigernde Wirkung. Erhöhte Leukotrienkonzentrationen (LTC_4) wurden in Glioblastomen und im umliegenden perifokalen Ödem gefunden. Dabei bestand eine Korrelation zwischen der Höhe der LTC_4 -Konzentration und der Ausdehnung des peritumoralen Hirnödems (Black et al., 1986; Simmet et al., 1990). Im Zusammenhang mit der Entstehung von peritumoralen Ödemen wurde darüber hinaus die Rolle von Stickstoffmonoxid (NO) untersucht. Stickstoffmonoxid wurde als ein spezifischer Mediator der Vasodilatation und des tumoralen Blutflusses in primären Hirntumoren identifiziert. Als eine Folge der Tumorphypoxie kommt es zu einer Induktion von Isoenzymen der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS). Es wird davon ausgegangen, dass die Synthese und die Freisetzung von NO in der VEGF induzierten Ödembildung eine entscheidende Rolle spielt (Mayhan, 1999). Weitere vasogene Substanzen, die möglicherweise zur Entstehung des peritumoralen Hirnödems beitragen, sind Serotonin, Thromboxane und PAF (Gaetani et al., 1991; Hirashima et al., 1998).

1.5.3 Behandlung des Hirnödems

Die Therapie eines erhöhten intrakraniellen Drucks ist ein Zusammenspiel aus sich ergänzenden Maßnahmen. Zum einen werden operative Maßnahmen wie die Anlage

einer externen Ventrikeldrainage oder eine Dekompressionskraniotomie durchgeführt. Zum anderen werden konservative Therapiemaßnahmen (mäßige Oberkörperhochlagerung, moderate Hyperventilation, mäßige Hypothermie, Vasopressoren zur Anhebung des CPP, Gabe von Schleifendiuretika und hyperosmolaren Lösungen, Barbituratnarkose) angewendet (Bullock et al., 1995; Povlishock, 2000).

Glukokortikoide, wie Dexamethason, werden zur Therapie des vasogenen Hirnödems eingesetzt. Sie stellen in der Behandlung von Glioblastomen eine Standardmedikation dar. Sie sind in der Lage, die Liquorproduktion zu hemmen und die Liquorabsorption zu verstärken (Love et al., 1984; Eisenberg et al., 1970). Dadurch wird das perifokale, den Tumor umgebende Ödem reduziert, die raumfordernde Wirkung des intrakraniellen Prozesses reduziert und eventuell vorliegende neurologische Symptome verbessert. In einer in-vitro Untersuchung an kultivierten Zellen von malignen Gliomen konnte eine Unterdrückung der Produktion von Enzymen wie den Vascular Permeability Factor (VPF) und den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) durch Gabe von Dexamethason gezeigt werden. Dies führte in der Summe zu einer Abnahme des Ödems (Criscuolo et al., 1989).

1.6 Eikosanoide

Die Metaboliten der Arachidonsäure werden nach ihrer chemischen Struktur unter dem Begriff Eikosanoide (mehrfach ungesättigte C₂₀-Fettsäure; griechisch „eikosi“ = zwanzig) zusammengefasst. Die Eikosanoide werden auch als Gewebshormone bezeichnet, da ihr Wirkort in der Nähe des Ortes ihrer Biosynthese liegt. Ihre biologische Halbwertszeit liegt im Minutenbereich. Die meisten Eikosanoide sind Entzündungsmediatoren. In Abbildung 10 ist die Entstehung der Arachidonsäure und ihrer Metaboliten dargestellt.

nach Stimulierung der Zelle aus Vorstufen synthetisiert. Ihre Bildung setzt einen intakten Enzymapparat für den Arachidonsäuremetabolismus und einen Signaltransfer von der Zelloberfläche in das Zellinnere voraus. Ein Schlüsselenzym für die Arachidonsäurefreisetzung ist die Phospholipase A₂, die durch Bindung von Adrenalin, Acetylcholin oder Histamin an spezifische Rezeptoren der Zellmembran aktiviert wird. Ein anderer Auslöser für die Aktivierung ist die Zerstörung von Membranstrukturen, beispielsweise als Folge von Traumen.

Arachidonsäureprodukte spielen eine entscheidende Rolle in der Regulation von Entzündungsreaktionen und Immunantworten. Eine Vielzahl pathophysiologischer Prozesse ist an ihre Anwesenheit gebunden. Eine gesteigerte Leukotriensynthese im ZNS ließ sich unter pathologischen Bedingungen, wie Ischämie, Trauma, Hämorrhagien sowie bei zerebralen Tumorerkrankungen nachweisen (Black et al., 1986; Kiwak et al., 1985; Simmet et al., 1990; Winking et al., 1996; Winking et al., 1998). Die Aktivierung in der Körperperipherie ist Ca²⁺-abhängig. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass in Mitochondrien von Rattenhirnen Phospholipase A₂ auch Ca²⁺-unabhängig reagieren kann (Dennis, 1997). Die Freisetzung neuronaler Phospholipase A₂ ist an eine Vielzahl von Rezeptoren gebunden (Westcott et al., 1998). Wie aus Abbildung 10 hervorgeht, leitet das Enzym Cyclooxygenase die Synthese von Prostaglandinen, Prostacyclinen und Thromboxanen aus der Arachidonsäure ein. Die Cyclooxygenase besteht aus zwei Unterformen: Cyclooxygenase-1 (COX-1) und Cyclooxygenase-2 (COX-2). Während COX-1 für wichtige Organfunktionen, wie die Regulierung der Nierendurchblutung und den Schutz der Magenschleimhaut vor der Magensäure zuständig ist, leitet COX-2 bei Freisetzung eine Entzündungsreaktion ein. Durch selektive COX-2 Inhibitoren wie Ibuprofen oder Indometazin kann dieses Enzym selektiv gehemmt werden. Die Lipoxygenase dagegen katalysiert die Bildung von Leukotrienen und Hydroxyfettsäuren.

1.6.2 Biologische Wirkung der Leukotriene

Leukotriene wurden erstmals 1979 beschrieben. Die Bezeichnung nimmt Bezug auf die Herkunft aus neutrophilen oder basophilen Leukozyten (Leuko-) und auf die drei konjugierten Doppelbindungen (-triene) dieser Substanzklasse (Borgeat und

Samuellsen, 1979). Der entscheidende Stimulus für die Synthese aus der Arachidonsäure sind Entzündungsreaktionen, z. B. hervorgerufen durch Ischämie, Trauma, Hämorrhagie oder Tumorerkrankungen. In Abbildung 11 ist die Leukotrienkaskade dargestellt.

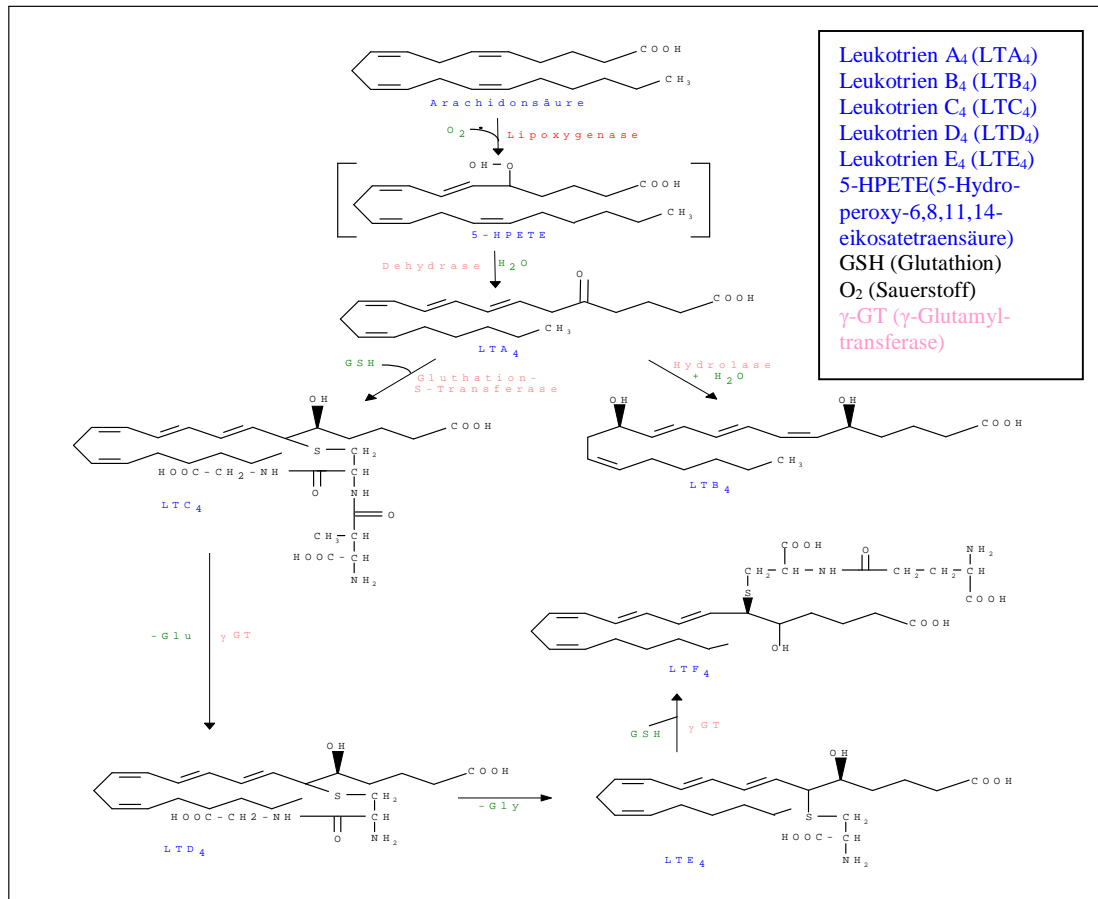


Abb. 11: Biosynthese der Leukotriene aus der Ausgangssubstanz Arachidonsäure.

Wie in Abbildung 11 gezeigt, sind Leukotriene Produkte des Lipoxigenaseweges der Arachidonsäure. Das Enzym 5-Lipoxigenase stellt das Schlüsselenzym bei der Leukotriensynthese dar. Durch einen zellulären Stimulus wird das im Zytosol befindliche Enzym aktiviert und bindet sich an die nukleäre Membran (Brock et al., 1994). Durch die Aktivität der Lipoxigenase entsteht eine Serie von hydroxylierten, vielfach ungesättigten Fettsäuren wie 5-HPETE, 12-HPETE und Leukotrienen. Aus 5-HPETE wird durch Dehydratation das instabile Leukotrien A₄ (LTA₄) gebildet. Das instabile Leukotrien A₄ kann in polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen der Lunge enzymatisch zu LTB₄ hydroxyliert werden (Samuelsson, 1987 und 2000). Nach der Übertragung des Tripeptids Glutathion auf

Leukotrien A₄ durch das spezifische Enzym Glutathion-S-Transferase entsteht Leukotrien C₄ (LTC₄). Durch Abspaltung einzelner Aminosäuren entstehen Leukotrien D₄ (LTD₄) und Leukotrien E₄ (LTE₄) (Samuelsson, 1987 und 2000; Peters-Golden, 1998). Leukotrien E₄ wird anschließend durch eine γ -Glutamyl-Transpeptidase in Gegenwart von Glutathion in LTF₄ überführt. Wird 5-HPETE am C-12-Atom hydroxiliert, entsteht das Leukotrien B₄ (LTB₄). Die Buchstaben C, D, E und F charakterisieren dabei die unterschiedliche Länge der Peptidseitenketten. Der Zahlenwert beschreibt die Anzahl der Doppelbindungen im Molekül der Arachidonsäure.

Die Leukotriene LTC₄, LTD₄ und LTE₄ werden auch als Cysteinyl-Leukotriene bezeichnet. LTC₄ ist der Hauptmetabolit in der Gruppe der Cysteinyl-Leukotriene. Als biologische Hauptwirkungen sind bei diesen Substanzen langsame und lang anhaltende Kontraktionen der glatten Muskulatur, besonders der Bronchien, sowie eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität und eine erhöhte Mukussekretion nachgewiesen. Durch Kontraktion der Gefäßwandmuskulatur und der Endothelzellen von Kapillaren und Venolen entsteht über Plasmaextravasation ein vasogenes Ödem (Dahlén et al., 1987).

1.6.3 Leukotriene im zentralen Nervensystem

Die physiologischen Syntheseorte der Leukotriene im ZNS sind die weiße und graue Hirnsubstanz (Simmet et al., 1989 und 1990; Seregi et al., 1990). Der Hauptsyntheseort ist die Astroglia. Die Aktivität der 5-Lipoxygenase ist dabei sehr unterschiedlich. Im Bulbus olfaktorius und in der Hypophyse wurden die höchsten Werte gemessen, gefolgt von Cortex, Corpus striatum und Hypothalamus (Shimizu et al., 1987; Seregi et al., 1990). Im ZNS werden über eine Vielzahl von Lipoxygenasestoffwechselwegen ungesättigte Fettsäuren gebildet. In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass neben einer Calcium-abhängigen Lipoxygenase auch eine Leukotrien B₄-Hydroxylase zur Synthese von LTB₄ führt (Shimizu et al., 1987).

1.6.4 Leukotriene im Hirntumorgewebe

Maligne Hirntumoren werden von einem tumoralen Ödem, hauptsächlich vom vasogenen Typ, begleitet (Samdani et al., 1997). Die Ursache hierfür liegt in einer

Störung der Blut-Hirn-Schranke. Unter diesen pathologischen Bedingungen können Plasmabestandteile von niedrigem bis hohem Molekulargewicht die Hirnkapillaren verlassen und einen Flüssigkeitsstrom in den Extrazellulärraum bewirken (Schilling und Wahl, 1997).

Mediatoren spielen bei den pathophysiologischen Abläufen der Entwicklung eines vasogenen Hirnödems eine entscheidende Rolle. Sie werden durch geschädigtes Hirngewebe bzw. Tumorgewebe freigesetzt und sind in der Lage, die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke zu beeinflussen. Zu den Mediatoren zählen Histamin, Bradykinin, Serotonin, Interleukine und Leukotriene (Black et al., 1990). Es konnte gezeigt werden, dass im Bereich von malignen Hirntumoren Leukotriene die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke erhöhen (Black et al., 1990; Chio et al., 1992). Weiterhin konnte eine Korrelation zwischen der Leukotrienbildung (LTC_4) in malignen Gliomen und dem Ausmaß des peritumoralen Ödems gezeigt werden (Black et al., 1986; Simmet et al., 1990). Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass eine Korrelation zwischen der Biosynthesekapazität für Cysteinyl-Leukotriene im Tumorgewebe und dem Malignitätsgrad besteht. Bei Patienten mit malignen Astrozytomen wurden vor dem operativen Entfernen des Hirntumors hohe Mengen an LTE_4 im Urin gemessen. Die gemessenen LTE_4 Konzentrationen im Urin am 7. post-operativen Tag zeigten im Vergleich zu den prä-operativ gemessenen Mengen einen Abfall bis zu 90 % (Winking et al., 1996). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass in malignen Gliomen das Enzym γ -Glutamyltranspeptidase (γ -GPT) vermindert ist. Dieses Enzym inaktiviert Leukotriene und reduziert auf diese Weise ihre Wirkung (Black et al., 1990; Baba et al., 1991). Die Folge der mangelnden Leukotrien-Inaktivierung ist eine lokale Steigerung der cerebralen Vasopermeabilität mit fokaler Ödementstehung.

1.7 Topoisomerasen

Die räumliche Organisation der DNA (Topologie) spielt eine essentielle Rolle bei zellulären Prozessen wie Zellteilung, Rekombination von Genen und bei der Transkription. Damit die DNA in der Zelle Platz findet, ist eine etwa 1000-fache Kondensation der DNA notwendig. Für diese Komprimierung sind einerseits Wechselwirkungen mit zweiwertigen Kationen und Proteinen, andererseits eine

spezielle Topologie der beiden komplementären DNA-Moleküle, die Superhelix, verantwortlich. Ein DNA-Molekül besitzt aufgrund der positiven Doppelhelix eine feste Anzahl an Verknüpfungen der beiden komplementären und umeinander gewundenen DNA-Stränge. In dieser Position ist die DNA im so genannten relaxierten Zustand. Die DNA-Moleküle müssen für Ablesevorgänge partiell entwunden werden. Das Auftrennen der Stränge erzeugt topologisch bedingte Spannungen in der helikalen DNA-Struktur. Diese Spannungen werden durch die Wirkung von Topoisomerasen aufgehoben.

Topoisomerasen sind für alle Zellen essentiell (Wang, 1996). Bei allen Reaktionen, bei denen die Topologie der DNA verändert wird, spielen die Topoisomerasen eine wichtige Rolle, zum Beispiel bei der Transkription oder der Rekombination von Genen. Im Wesentlichen arbeiten die Topoisomerasen der Eukaryonten und der Prokaryonten gleich. Die Topoisomerasen werden in zwei Familiensubtypen unterteilt: Topoisomerase Typ I und Topoisomerase Typ II. Die Einteilung erfolgt nach Induktion von Einzel- oder Doppelstrangbrüchen.

Topoisomerase Typ I

Die Topoisomerase Typ I ist ein im Zellkern lokalisiertes Protein, bestehend aus 765 Aminosäuren. Sie hat ein Molekulargewicht von 91 kDa (Larsen und Gobert, 1999). Ihre Aufgabe ist die sequentielle Trennung und Relegation eines DNA-Stranges. Sie ist ein Phosphoprotein und kann durch Serin/Threonin-Kinasen wie Proteinkinase C phosphoryliert werden. Eine Dephosphorylierung geht mit einem Verlust der Fähigkeit, superhelikale DNA zu relaxieren, einher (Yu et al., 2004). Die Topoisomerase Typ I verursacht energieunabhängige Einzelstrangbrüche, indem sie sowohl an negative als auch an positive superhelikale DNA bindet. Das monomere Enzym wird nach Öffnen der beiden DNA-Stränge kovalent an das 5'-Phosphat des gespaltenen DNA-Stranges gebunden. Der intakte Strang wird durch den DNA-Spalt geführt. Nach Abtrennen des Enzyms vom 5'-Phosphatende wird die Phosphodiesterasebindung des DNA-Strangs wieder verschlossen (Schneider et al., 1990).

Topoisomerase Typ II

Die Topoisomerase Typ II ist ein Protein mit der Größe von 170 kDa. Die Topoisomerase Typ II, die aus zwei identischen Untereinheiten aufgebaut ist, kommt in Form von DNA-Topoisomerase IIa und IIb vor (Tan et al., 1992). Sie unterscheiden sich durch biochemische und pharmakologische Eigenschaften. Die Topoisomerase Typ II verursacht eine vorübergehende Spaltung beider Stränge in einer ATP-abhängigen Reaktion. Durch Schneiden des gebundenen DNA-Doppelstrangs entstehen kurze, überhängende Einzelstrangenden. Durch die kovalente Bindung von Phosphat-Gruppen an die Enzymuntereinheiten ist Topoisomerase Typ II in der Lage einen DNA-Doppelstrang durch einen weiteren (oder gleiches Segment des gleichen Stranges) hindurchzuführen. Die kovalenten Bindungen werden gelöst und die DNA wieder verschlossen.

Topoisomerase Typ I und Typ II unterscheiden sich neben ihrer Funktion auch in ihrem Regulationsmechanismus. Die Topoisomerase Typ II weist, je nach Wachstumszustand der Zelle, eine zyklusabhängige Aktivität auf. Topoisomerase Typ I dagegen weist keine ausgeprägte Zellzyklusabhängigkeit auf (Hwang et al., 1989). In verschiedenen Studien konnte ein Zusammenhang zwischen der Aktivität von Topoisomerase Typ I oder II und Malignisierung von Gewebe beobachtet werden. So zeigen Studien an Kolonkarzinomgewebe eine Erhöhung der Topoisomerase I Aktivität. Hier besteht eine Korrelation zwischen dem Malignitätsgrad und der Erhöhung der Topoisomerase I Aktivität (Giovanella et al., 1989). In anderen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass es in entarteten Zellen zu einer weitgehenden Aufhebung der zellzyklusabhängigen Aktivität von Topoisomerase II kommt. Hier bleibt die Aktivität auf einem konstant hohen Niveau und ist kaum durch äußere Bedingungen beeinflussbar (Sullivan et al., 1987). Die pharmakologische Blockierung dieser Enzyme gewann daher hinsichtlich der Entwicklung neuer antimikrobieller Substanzen und Antitumormedikamente an Bedeutung (Burden und Osheroff, 1998).

2 Weihrauch

2.1 Weihrauch in der Medizin

Weihrauch spielte bereits im Altertum eine herausragende Rolle bei der Götterverehrung, aber auch in der Medizin und in der Kosmetik. Überliefert ist, dass um 2400 v. Chr. der ägyptische König Sahure eine Schiffsexpedition in das heutige Somalia schickte, um von dort die Weihrauchpflanze (lat. „Boswellia“) nach Ägypten bringen zu lassen. In den Schriften von Hippokrates (406 - 377 v. Chr.) gehört Weihrauch zu den meist empfohlenen Arzneimitteln. In Indien wird der Weihrauch seit langem in der traditionellen Medizin, wie z.B. Ayurveda als Arzneimittel bei Rheumatismus, Fettleibigkeit und anderen Krankheiten verwendet. Die Ayurveda-Medizin behandelt auch Wunden, Geschwüre, Tumoren von Magen, Leber und Milz sowie Wucherungen der Augenbindehaut, Brustwarzenkrebs, Abdominal- und Analtumoren, tuberkulöse Restherde, Arthritis oder Gicht mit Weihrauchprodukten. Sie galten nicht nur als schmerzstillende, sondern auch als sedierende Mittel und wurden deshalb auch zur Behandlung von Nervenkrankheiten eingesetzt (Ammon, 1992).

Erst im 20. Jahrhundert wurden wissenschaftliche Untersuchungen der Bestandteile und der medizinischen Anwendungsmöglichkeiten von Weihrauch bzw. Weihrauchextrakten durchgeführt und dokumentiert. Ein allgemein gestiegenes Interesse an pflanzlichen Heilmitteln hat zu einem erneuten Interesse am Weihrauch geführt. Am eingehendsten erforscht ist die Anwendung im Bereich der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. Beide Krankheiten sind durch unklare Krankheitsentstehung und chronischen Verlauf mit wechselhafter Schwere gekennzeichnet (Ritter, 1998; Chang et al., 2001; Podolsky, 2002). Weihrauchpräparate verbessern bei Morbus Crohn die Lebensqualität (Gerhardt et al., 2000; Gerhardt, 2001; Seifert und Gerhardt, 2001).

Tabelle 4 gibt einen Überblick über die historische und medizinische Verwendung der Weihrauchprodukte.

Tab. 4: Historische und moderne medizinische Verwendung von Teilen des Weihrauchbaumes.

Boswellia-Spezies	Pflanzenteil	Verwendung
Verschiedene	Harz	Viele Länder: Asthma, Uterusleiden, in Pflastern und Salben; Haut- und Blutkrankheiten, Fieber, Schlangenbisse, Krämpfe, Katarrh, Ausschlag, Pflasterherstellung
	Rinde	Indien: Asthma, Dysenterie, Geschwüre, Hautkrankheiten, „zur Blutreinigung“
	Früchte, Blüten	Leukodermie, Hämorrhoiden
B. serrata	Harz	Indien: Rheuma, „Nervenleiden“, Diabetes, Magenbeschwerden, Haut-, Lungen- und weitere Krankheiten, Durchfall, Dysenterie, Lungen- und Hauterkrankungen, Fieber, Geschwüre und weitere Krankheiten
	Rinde	Indien: Epilepsie, Leukodermie, Rippenfellentzündung, Schlangenbisse, Wundbehandlung, Erkältungen, Durchfall, Hauterkrankungen
	Blätter	Indien: Wundbehandlung, Augenkrankheiten
	Samen	Indien: Schlangenbisse, Haarwuchsmittel
	Ganze Pflanze	Afrika: Antiseptikum
B. dalzielli	Ganze Pflanze	Afrika: Wundbehandlung
	Blätter, Wurzelrinde	Afrika: Irrsinn
	Rinde	Afrika: Windpocken, Schlangenbisse, Magen-Darm-Beschwerden, Fieber, Rheuma, Schmerzen, Schwindel, Dysenterie
	Wurzel	Afrika: Syphilis
	Wurzel, Rinde	Afrika: Gegenmittel bei Pfeilgiften, Emetikum
	Harz	Afrika: als Antiseptikum
B. microphylla	Wurzel	Somalia: Durchfall
B. neglecta	Wurzel	Gonorrhö, als Diuretikum
B. ovalifoliolata	Stamm (Rinde)	Indien: Hydrozele, Entzündungen, Schwellungen, Magengeschwüre
B. sacra	Harz, Holz	Afrika: als Diuretikum, Husten, Expektorans, Bilharziose, Syphilis, Magenschmerzen, Duftmittel
B. frereana	Harz, Holz	Duftmittel
B. carterii	Harz, Holz	Duftmittel

(Weeks, 2003)

2.1.1 Botanische Grundlagen

Der Weihrauchbaum gehört zur Gattung der Balsambaumgewächse (lat. „Burseraceae“). Die Bäume oder Dornsträucher werden bis zu 6m hoch und sind mit über 20 Arten in den Trockengebieten Ost-Afrikas, Indiens und der arabischen Halbinsel verbreitet. Ihre Blätter sind unpaarig gefiedert. Ihre Blüten sind weiß bis rötlich und ihre Steinfrüchte dreikantig (Abbildung 12).

Es sind die zwei Weihraucharten „Olibanum“ und „Salai guggal“ zu unterscheiden. Das arabische Harz „Olibanum“ wird vor allem aus den Arten *Boswellia sacra* flueck

(Südarabien), *Boswellia carteri* (Somalia) und *Boswellia frereana* (Somalia) gewonnen. Wichtigster Lieferant für das indische Harz „Salai guggal“ ist *Boswellia serrata* (Ostindien). Allen Boswellien ist gemein, dass sie trockene Klimate und felsige Böden bevorzugen. Sie reagieren auf die Nährstoffknappheit der Standorte mit einer flachen und breiten Wurzelbildung. Dies bedingt große Abstände zwischen den einzelnen Bäumen.

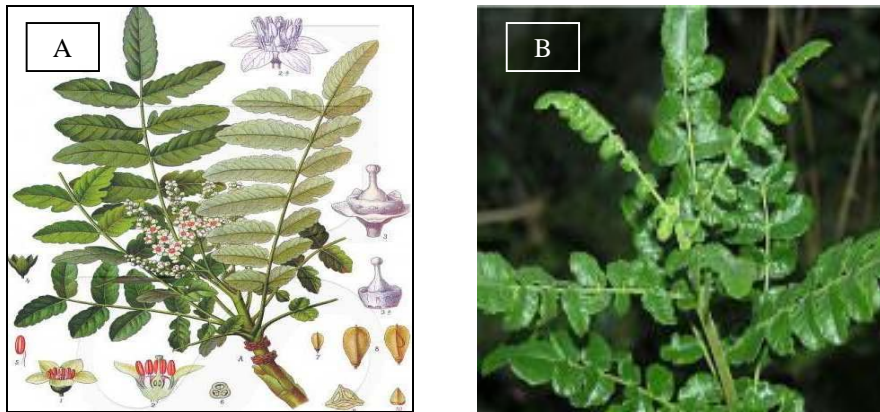


Abb. 12: A: *Boswellia sacra*, B: *Boswellia serrata*

2.1.2 Weihrauch als Phytopharmakon

Phytopharmaka sind Arzneizubereitungen aus Pflanzen. Die arzneiliche Wirkung ergibt sich häufig aus dem Zusammenspiel mehrerer natürlicher Inhaltsstoffe. Phytopharmaka werden häufig durch Extraktion aus dem Pflanzenmaterial gewonnen. Anhand des Gehaltes bekannter Wirkstoffe können die Extrakte der Phytopharmaka standardisiert und mit relativ konstanter Dosierung verabreicht werden. Phytopharmaka unterliegen gemäß Arzneimittelgesetz den gleichen Anforderungen hinsichtlich Qualität, Unbedenklichkeit und Wirksamkeit wie chemisch-pharmazeutische Arzneimittel (Teuscher, 1997).

2.1.3 Gewinnung und Inhaltsstoffe des Weihrauchextraktes

Zur Gewinnung von Weihrauchharzen werden die Stämme der Boswellien in den Monaten März und April angeschnitten. Dabei tritt ein milchiger Saft aus, der in den Zellzwischenräumen der Pflanzen gebildet wird. Je nach Größe und Dicke von Stamm bzw. Ästen werden 10 bis 30 Schnittstellen angebracht. Die beim Anschnitt

austretende Flüssigkeit erstarrt an der Luft zu gelblichen, rötlichen oder bräunlichen Harzkörnern (Abbildung 13).



Abb. 13: Harz der Weihrauchpflanze

Das aus dem ersten Anschnitt gewonnene Harz, das nach etwa drei Wochen abgekratzt wird, ist wegen minderwertiger Qualität üblicherweise nicht zu verwenden. Das später austretende Harz ist von guter Qualität und wird nach ein bis zwei Wochen geerntet. In den kommenden Monaten kann der Erntevorgang im Abstand weniger Wochen wiederholt werden. Nach drei Nutzungsjahren in Folge brauchen die Bäume eine mehrjährige Ruhephase. Ein Weihrauchbaum erbringt während einer dreijährigen Ernteperiode zwischen 3 und 10 kg Harz.

Diese Rohsubstanz besteht aus:

- Harz (55–57 %)
- Gummi (20–23 %)
- Wasser (10–12 %)
- ätherische Öle (8–9 %)
- unlösliche Bestandteile (4–5 %)

Der Extrakt für den medizinischen Gebrauch wird in drei Arbeitsschritten aus der Rohsubstanz gewonnen. Zunächst werden die gemörserten Weihrauchkörner in 80 °C heißem Petroläther extrahiert. Dieser Vorgang wird drei Mal wiederholt. Schließlich bleibt ein völlig entfetteter Rest zurück, der mit 95-prozentigem Ethanol

filtriert wird. Der so erhaltene alkoholische Extrakt wird im Vakuum zu einem Pulver konzentriert (Singh et al., 1996).

Als medizinisch aktive Inhaltsstoffe des Extraktes wurden Boswelliasäuren identifiziert. HPLC- und Dünnschichtchromatographien zeigen, dass das Trockenextrakt H15[®] aus *Boswellia serrata* einen weitgehend konstanten Boswelliasäure-Gehalt über viele Chargen hinweg aufweist (Ennet et al., 2000).

2.2 Boswelliasäuren

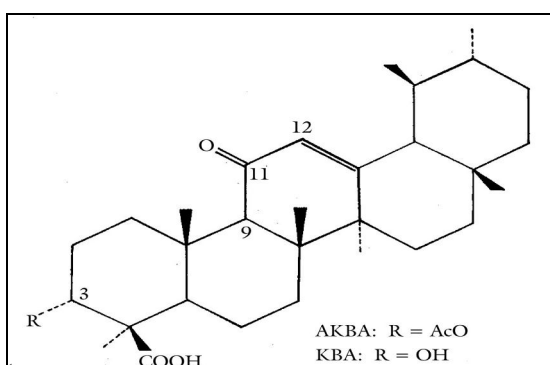
2.2.1 Einleitung

Chemische Untersuchungen der Weihrauchharze gehen bis in die Anfänge der wissenschaftlichen Chemie zurück (Tschirch, 1900; Tschirch und Halbey, 1898). Aufgrund der Komplexität der Harze wurde ihre genauere Untersuchung erst durch die moderne Analytik möglich und gewann in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts an Intensität.

Grundlegende Untersuchungen von Weihrauchharz und Harzen anderer Pflanzen wurden von Tschirch und Halbey durchgeführt. Sie publizierten 1898 erste systematische Arbeiten zu sauren Komponenten im Weihrauch. Halbey erhielt durch alkoholisches Extrahieren von Weihrauchharz, Isolieren der Säurefraktion durch Ausschütteln der ätherischen Lösung mit Sodalösung und wiederholtes Umfällen des isolierten Rohproduktes „Boswelliasäure“ (Tschirch und Halbey, 1898). Diese Verbindung wurde von den Autoren als einbasige Säure der Summenformel $C_{32}H_{52}O_4$ ohne freie Hydroxylgruppe charakterisiert. Aus der nach Halbey gewonnenen Boswelliasäure wurden erstmals 1932 durch Winterstein und Stein β -Boswelliasäure (β -BA), 3-O-Acetyl- β -Boswelliasäure (β -ABA) und deren Isomere α -Boswelliasäure (α -BA) und 3-O-Acetyl- α -Boswelliasäure (α -ABA) als Reinsubstanz isoliert. Weiterhin bestimmten die Autoren die korrekte Summenformel mit $C_{32}H_{50}O_4$. Der Nachweis der Boswelliasäuren als Derivate des α - und β -Amyrins vereinfachte ihre systematische Untersuchung (Ruzicka und Wirtz, 1939, 1940). Die Einführung der Massenspektrometrie erlaubte schließlich die Strukturaufklärung der Verbindungen. Mit dieser Technik konnte zwischen verschiedenen *Boswellia*-Spezies unterschieden werden. Wenige Jahre später wurde

die bekannte Gruppe der Boswelliasäuren um die beiden Boswelliasäuren mit einer 11-Keto-Gruppe, 11-Keto- β -Boswelliasäure (β -KBA) und 3-Acetyl-11-Keto- β -Boswelliasäure (β -AKBA), erweitert. Weiterhin wurden einige charakteristische ^1H - und ^{13}C -NMR-Verschiebungen veröffentlicht (Hairfield et al., 1984). Die Strukturaufklärung wurde schließlich durch die Veröffentlichung der Röntgenstrukturen von β -AKBA und β -KBA und durch die Veröffentlichung der NMR-Verschiebungen komplettiert (Schweizer et al., 2000; Rajnikant et al., 2001; Culioli et al., 2003; Belsner et al., 2003).

Die Boswelliasäuren gehören zu der Gruppe der Triterpene. Sie kommen frei oder als Saponine mit glykosidisch gebundenem Zucker in einer Vielzahl von Pflanzen vor (Basu und Rastogi, 1967; Agarwal und Rastogi, 1974; Brieskorn, 1987; Mahato et al., 1992). Durch ihre mannigfaltige Gerüststruktur und durch die variablen funktionellen Gruppen wird eine große Bandbreite chemischer Eigenschaften ermöglicht (Xu et al., 2004). Boswelliasäuren bestehen mit wenigen Ausnahmen aus C_{30} -Verbindungen und weisen ein Oleanan- ($\text{R}_1 = \text{CH}_3$, $\text{R}_2 = \text{H}$) bzw. Ursangerüst ($\text{R}_1 = \text{H}$, $\text{R}_2 = \text{CH}_3$) auf. Boswelliasäuren mit einem Oleanangerüst werden als α -Boswelliasäuren bezeichnet. Verfügen die Boswelliasäuren über ein Ursangerüst, werden sie β -Boswelliasäuren genannt. Die Verteilung der einzelnen Komponenten im Weihrauchharz wird in der Literatur uneinheitlich angegeben und unterliegt einer natürlichen Schwankungsbreite.



Molekularmassen:
KBA ($\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_4$): 470,69
AKBA ($\text{C}_{32}\text{H}_{48}\text{O}_5$): 512,73

Abb. 14: β -Boswelliasäure, ihre Molekülstruktur und Molekularmassen. 3-Acetyl-11-Keto- β -Boswelliasäure (β -AKBA), 11-Keto- β -Boswelliasäure (β -KBA).

2.2.2 Pharmakologische Wirkung

Die Triterpene sind eine umfangreiche Familie von Naturstoffen mit mehr als 4000 Vertretern. Außer einem gemeinsamen Biosyntheseweg zeigen sie kaum Ähnlichkeiten. In den vergangenen zwei Jahrzehnten wurden die pharmakologischen Mechanismen eingehender untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass ein ethanolischer Extrakt von *Salai guggal* (AESG), das als größte Fraktion ein Gemisch verschiedener Boswelliasäuren enthält, erhebliche antiinflammatorische und antiarthritische Aktivität aufweist. Weiterhin finden sich in der Literatur Hinweise auf analgetische, immunsuppressive, hepatoprotektive und antimikrobielle Wirkungen von Weihrauch (Safayhi und Sailer, 1997; Rios et al., 2000; Liu, 1995; Recio et al., 1995). Es wurde festgestellt, dass die chemische und pharmakologische Reaktionsweise der einzelnen Boswelliasäuren durch die 5-Ringstruktur der Triterpene sowie durch ihre funktionellen Gruppen bestimmt wird.

In einem tierexperimentellen Versuch wurden künstlich induzierte Ödeme in Mäusen und Ratten sowie Formaldehyd- und Tuberkelantigen-induzierte Arthritiden in Ratten durch perorale Gabe von AESG bzw. Phenylbutazon behandelt. Phenylbutazon ist ein etabliertes nichtsteroidales Antiphlogistikums (NSAID), das als klassischer Hemmstoff der Cyclooxygenase und damit als Suppressor der Prostaglandinsynthese fungiert. Durch die Behandlung mit AESG konnte die Ausbildung des Ödems sowie die Ausprägung der Arthritiden signifikant vermindert werden. Weiterhin fanden sich bei den Tieren der AESG-Gruppe trotz der antiinflammatorischen Wirksamkeit keine NSAID-typischen Nebenwirkungen. Antipyretische und analgetische Effekte wurden ebenfalls nicht beobachtet. Aus diesen Ergebnissen schlossen die Autoren, dass es sich bei dem Wirkmechanismus von AESG nicht um eine Unterdrückung der Prostaglandinsynthese durch Cyclooxygenaseinhibitoren handeln konnte (Vane, 1971). In weiteren Studien wurde festgestellt, dass auch bei verabreichten AESG-Mengen, die deutlich über den therapeutisch wirksamen Dosen lagen, keinerlei kardiovaskuläre, respiratorische oder zentralnervöse Nebenwirkungen auftraten (Singh et al., 1986). Später wurde die Hemmung des Enzyms 5-Lipoxygenase (5-LOX) als weitere pharmakologisch bedeutsame Wirkung von Boswelliasäuren nachgewiesen (Ammon et al., 1991; Safayhi et al., 1992). Auf dieser Entdeckung basierend, wurden der

Wirkmechanismus der 5-LOX-Inhibition und die strukturellen Voraussetzungen für eine effektive Inhibierung geklärt (Safayhi et al., 1995; Sailer et al., 1996).

Die 5-LOX ist ein Schlüsselenzym der Entzündungsreaktion. Die vier wichtigsten β -Boswelliasäuren (β -Boswelliasäure, 3-O-Acetyl- β -Boswelliasäure, 11-Keto- β -Boswelliasäure, 3-Acetyl-11-Keto- β -Boswelliasäure) hemmen die 5-LOX mit IC_{50} -Konzentrationen von 1,5-7 ng (Safayhi et al., 1992). Nach dem Nachweis der β -Isomeren als wirkungsstärkste Faktoren der 5-Lipoxygenasehemmung wurde der Mechanismus der Hemmung am Beispiel der Acetyl-11-Keto- β -Boswelliasäure (Abbildung 15, A) genauer untersucht (Safayhi et al., 1995). In vitro Untersuchungen in segmentkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) von Ratten zeigten spezifische Auswirkungen von AESG auf den 5-Lipoxygenasestoffwechsel. Die Hauptprodukte dieses Metabolismus in den PMN der Ratten – je nach vorherrschendem Enzymmuster einer Zelle werden unterschiedliche Substanzen gebildet – sind 5-HETE und LTB_4 (Ammon et al., 1991). Die Ergebnisse zeigten, dass AESG die LTB_4 - und die 5-HETE-Produktion in Ratten-PMN konzentrationsabhängig hemmt, und dass diese Inhibition alle gemessenen 5-Lipoxygenaseprodukte in gleichem Ausmaß betrifft. Keine 5-Lipoxygenaseinhibition wurde hingegen in Ratten-PMN beobachtet, wenn andere natürliche pentazyklische Triterpene wie α -Amyrin (Abbildung 15, B), Ursolsäure (Abbildung 15, C) oder Cortison (Abbildung 15, D) in vergleichbaren Konzentrationen verwendet wurden. Es konnte gezeigt werden, dass AESG eine inhibitorische Wirkung auf das Enzym 5-Lipoxygenase ausübt und somit die Transformation freier Arachidonsäure zu Leukotrienen blockiert. Die Acetyl- β -Boswelliasäure zeigte die stärkste antiinflammatorische Wirkung, gefolgt von Acetyl-11-Keto- β -Boswelliasäure und β -Boswelliasäure. Amyrin hatte lediglich eine geringe Wirkung (Ammon et al., 1991).

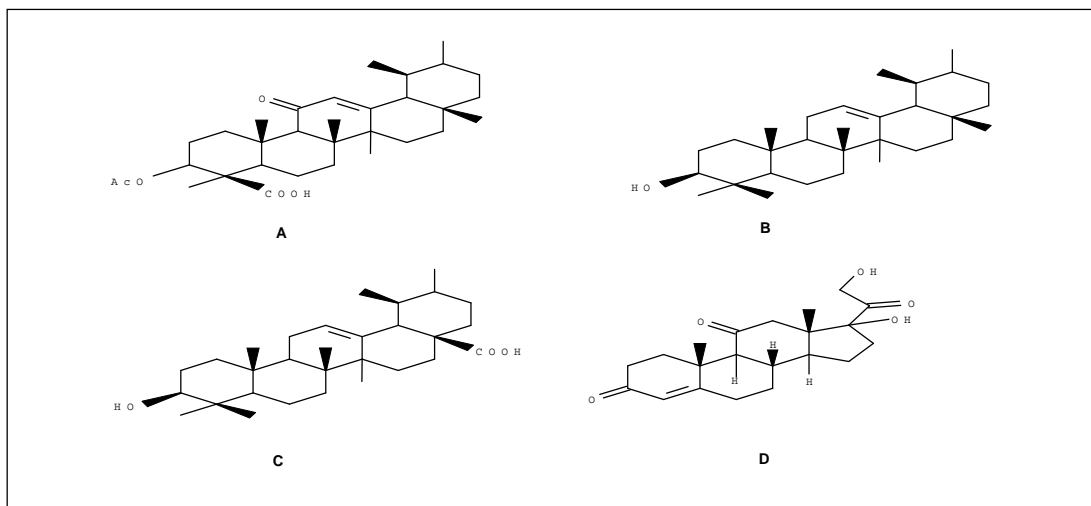


Abb. 15: Strukturformeln von Acetyl-11-Keto-β-Boswelliasäure (A), α-Amyrin (B), Ursolsäure (C) und Cortison (D).

Im Gegensatz zu vielen bekannten Hemmstoffen der Leukotrienbiosynthese haben Boswelliasäuren keinen antioxidativen Effekt (Safayhi et al., 1992). Es handelt sich vielmehr um nicht redoxvermittelte, nicht kompetitive, reversible Wirkungen an der 5-Lipoxygenase (Ammon et al., 1991; Ammon et al., 1993; Ammon 1996; Safayhi et al., 2000). Unter Verwendung einer Serie von synthetisch modifizierten Boswelliasäurederivaten konnte gezeigt werden, dass das Ringsystem der pentazyklischen Triterpene für die hoch selektive Bindung an die 5-Lipoxygenase verantwortlich ist. Eine zentrale Bedeutung hat dabei die Keto-Gruppe an C₁₁ in Kombination mit der hydrophilen Gruppe an C₄ des Ringes A (Sailer et al., 1996). Später konnte auf der 5-Lipoxygenase eine Bindungsstelle für Boswelliasäuren identifiziert werden (Safayhi et al., 1997). Acetyl-11-Keto-β-Boswelliasäure in höhere Konzentration (15 μM), sowie Amyrin oder Ursolsäure können in vitro die Aktivität von humaner Leukocytinelastase hemmen. Die gleichzeitige Inhibition von 5-Lipoxygenase und humaner Leukocytinelastase durch die Acetyl-11-Keto-β-Boswelliasäure ist dabei einzigartig (Safayhi et al., 1997).

In Folgestudien konnte eine Proliferationshemmung von Leukämie- oder Glioblastomzellen durch Boswelliasäuren nachgewiesen werden. So zeigte beispielsweise Acetyl-Boswelliasäure einen zytotoxischen Effekt auf menschliche Leukämie HL-60 Zellen (Shao et al., 1998). In in vitro Untersuchungen wurde der Einfluss von Acetyl-Boswelliasäuren auf den apoptotischen Zelltod von Gliomzellen

untersucht. Hier zeigte sich, dass Boswelliasäuren konzentrationsabhängig Apoptose in Gliomzellen induzieren (Glaser et al., 1999). Diese Wirkung ist nicht durch die Hemmung der 5-Lipoxygenase, sondern durch eine Inhibierung der Topoisomerasen I und IIa bedingt. Acetyl-Boswelliasäuren beeinträchtigen die Funktion der Topoisomerasen, indem sie direkt an die hoch affinen Bindungsstellen beider Enzyme binden (Hoernlein et al., 1999; Syrovets et al., 2000). Das Wirkprinzip wird dabei so beschrieben, dass die Triterpene mit der DNA um die Bindung an die Enzyme konkurrieren (Held et al., 1996).

2.2.3 Nebenwirkungen

Zu den Nebenwirkungen von H15[®] liegen wenige Daten vor. In einer Studie an 29 Patienten wurde bei einem Patient Übelkeit und Erbrechen beobachtet. Bei zwei anderen Patienten traten Hautausschläge nach zweitägiger Medikamentenapplikation auf. Die Hautausschläge klangen nach symptomatischer Therapie ohne Residuen ab (Böker et al., 1997). Zwei Patienten entwickelten nach längerfristiger, unkontrollierter Einnahme hoher Dosen des Trockenextraktes (3,6 g/d bzw. 10 g/d) eine Neutropenie. Ein weiterer Patient entwickelte unter der Therapie mit H15[®] (3,6 g/d für 1 Monat, dann 1,6 g/d für weitere 2 Monate) und gleichzeitiger Einnahme von Immunsuppressiva und Analgetika eine Azoospermie (Safayhi und Sailer, 1997). In weiteren Studien wird vereinzelt über gastrointestinale Beschwerden, Appetitlosigkeit und Brennen hinter der Brust, verbunden mit einer Hyperazidität, berichtet (Gupta et al., 1997). Neuere Studien dagegen zeigen eine gute Verträglichkeit von H 15 (Janssen et al., 2000; Streffer et al., 2001).

Die akute Toxizität von Boswelliasäuren scheint tierexperimentell sehr niedrig zu sein (LD₅₀ bei Mäusen und Ratten 2g/kg) (Singh et al., 1996). Auch Untersuchungen zur subakuten und chronischen Toxizität bei Ratten (250–1000 mg/d) und Rhesusaffen (125–500 mg/d) erbrachten bei biochemischen, hämatologischen, histopathologischen, klinischen und verhaltensbiologischen Parametern keine signifikanten Abnormitäten (Singh et al., 1996). Bislang liegen keine Hinweise auf genotoxische oder tumorigene Wirkungen vor (Singh et al., 1996). Allerdings sollte wegen der unvollständigen Datenlage zur Reproduktionstoxizität und zur Frage des Übertritts in die Muttermilch zumindest auf eine Einnahme während der

Schwangerschaft und Stillperiode verzichtet werden. Wechselwirkungen mit anderen Arzneimitteln wurden bislang nicht beschrieben, allerdings auch nicht systematisch untersucht.

3 Fragestellung

Das Ziel der vorliegenden experimentellen Studie war es, Hinweise zur Wirkung von Boswelliasäuren auf maligne Gliome in vivo zu gewinnen. Es sollte untersucht werden, ob sich die proliferationshemmenden und Apoptose induzierenden Eigenschaften von Boswelliasäuren auch im Tiermodell nachweisen lassen. Weiterhin sollte anhand einer Vitalitätsskala die Auswirkungen einer Behandlung mit H15[®] auf die Vitalität der Versuchstiere untersucht werden. Im Mittelpunkt standen dabei folgende Fragen:

1. Hat die Behandlung mit H15[®] einen Einfluss auf das Tumorzellen und welchen Einfluss hat dabei die verabreichte Dosis?
2. Ist bei der Behandlung mit H15[®] in den Tumorzellen eine Induktion von Apoptose nachzuweisen und ist diese Apoptoseinduktion dosisabhängig?
3. Wie wirkt sich die Behandlung mit H15[®] auf die Vitalität der Tiere aus?

4 Material und Methoden

4.1 *Versuchsansatz*

Es sollte die Einsatzmöglichkeit des Phytopharmakons H15[®] zur Prophylaxe zur Verhinderung von Rezidiven nach Tumorresektion untersucht werden. Der Versuch sollte den üblichen Patienten mit Resttumorzellen eines Glioblastoma multiforme direkt nach der makroskopisch kompletten operativen Tumorresektion simulieren. Hierzu wurde ein C6-Rattengliommodell verwendet. Der Zustand der Tumorresektion am Patienten wurde durch Injektion von C6-Zellen in gesundes Hirngewebe von weiblichen Wistar-Ratten und durch den sofortigen Beginn (erster postoperativer Tag) der H15[®]-Therapie nach der Tumorimplantation simuliert. Durch den gewählten Versuchsansatz konnten die Wirkungen von H15[®] in einem sehr frühen Stadium des Tumorwachstums untersucht werden.

Für den Versuch wurden vier Gruppen (A, B, C, D), bestehend aus je 10 weiblichen Wistar-Ratten, gebildet. Jedes Tier wurde dabei einzeln und unmittelbar vor der Tumorimplantation in eine der vier Gruppen randomisiert. Für die Randomisierung wurde ein Würfel verwendet. Den Gruppen A, B und C wurden unterschiedliche Mengen H15[®] verabreicht. Die Gruppe D bildete die Kontrollgruppe und wurde nicht behandelt. Die Vitalität der Versuchstiere wurde täglich dokumentiert. Nach 14-tägiger Behandlung wurden die Tiere getötet und ihre Hirne entnommen. Die Hirne wurden hinsichtlich des Tumolvolumens und der Anzahl apoptotischer Zellen untersucht.

4.2 *Das C6-Rattengliommodell*

Das C6-Rattengliommodell ist ein Tumormodell, das im Sweet's Laboratorium des MGH (Massachusetts General Hospital) entwickelt wurde (Benda et al., 1968). Outbred-Wistarratten wurde wiederholt MNU (N-Methylnitrosourea) verabreicht. Als sie neurologische Symptome entwickelten, wurden sie euthanasiert, die Tumoren wurden extirpiert und in Zellkulturen angelegt. Diese Tumorzellen wurden geklont, als „C6“ benannt und histopathologisch als Astrozytom klassifiziert (Pfeiffer et al., 1970). Schließlich wurde die C6-Zelllinie von der ATCC (American Type Culture

Collection) aufgenommen und ist als dauerhafte Zelllinie verfügbar. Ein wesentlicher Nachteil dieser C6-Zelllinie ist ihre Abstammung. Da die C6-Zelllinie aus einer Outbred-Züchtung stammt, stehen keine gen-identischen Wirte zur Verfügung. Somit kann der Tumor in allogenen Wirten eine Immunreaktion auslösen. Das führt zu einer starken Limitierung der Einsetzbarkeit dieser Zelllinie in Studien, bei denen das Überleben des Wirtes den Endpunkt bildet.

Das C6-Gliom Tumormodell der Ratte wird zur Evaluierung von neuen Therapieformen bei malignen Gliomen eingesetzt (Breyer et al., 2000; Lee et al., 1988; Maron et al., 1996). Es eignet sich zur Beantwortung spezifischer neuroonkologischer Fragestellungen, da es zahlreiche pathophysiologische Besonderheiten maligner Gliome des Menschen widerspiegelt (San Galli et al., 1989). Das C6-Gliom Tumormodell der Ratte zeigt neben einem invasiven Tumorwachstum und Migration auch eine Neovaskularisation und eine Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke (Nagano et al., 1993; Bernstein et al., 1991; Abramowitch et al., 1995). Da für dieses Modell keine immunsuprimierten Tiere benötigt werden, stellt es an die Ausstattung des Labors und der Käfige keine hohen Anforderungen. Ein weiterer Vorteil dieses Modells ist seine relativ hohe Zuverlässigkeit. Durch das rasche Wachstum der C6-Zellen ist es in der Lage, innerhalb von 9 bis 10 Tagen Tumore zu induzieren.

Es bestehen zwei Möglichkeiten mittels C6-Zellen Gliome zu induzieren. Zum einen kann ein C6-Tumor durch Implantation von zuvor in vitro gezüchteten C6-Sphäroiden hergestellt werden. Zum anderen besteht die Möglichkeit der stereotaktischen Inokulation einer C6-Zellsuspension in den Cortex. Nachteil der ersten Methode ist, dass diese Tumore gegenüber dem umgebenden Gewebe abgekapselt sind und eher Hirnmetastasen gleichen, als invasiv wachsenden, malignen Gliomen (Farrell et al., 1987; San Galli et al., 1989). Ab dem vierten Tag nach stereotaktischer Injektion einer C6-Zellsuspension finden sich bereits einzelne infiltrativ wachsende Gliomzellen. Nach zwei bis drei Wochen erreichen diese Zellen auch weiter entfernte Hirnareale (Nagano et al., 1993). Weiterhin finden sich, ähnlich dem humanen Glioblastom, Bereiche mit Neovaskularisation entlang endothelialer Basalmembranen und Ödemflüssigkeit (Daumas-Duport et al., 1988; Nagano et al., 1993; Whittle et al., 1998).

Trotz der nachweisbaren Infiltration und der Ödem- und Nekrosebildung weisen C6-Gliome nicht alle Charakteristika menschlicher Glioblastome auf. Humane Glioblastome sind deutlich heterogener (Grobbs et al., 2002; Pilkington et al., 1990; Goldbrunner et al., 2004). Darüber hinaus ist bekannt, dass C6-Zellen deutlich schneller wachsen als humane Gliomzelllinien, was zu einer raschen Kompression des umliegenden Hirngewebes führt. Dies kann ein abgegrenztes Tumorwachstum vortäuschen, während das infiltrative Wachstum der C6-Zellen übersehen wird. Die mikroskopische Betrachtung der C6-Gliome belegt jedoch den invasiven Charakter dieser Zelllinie (Goldbrunner et al., 2004). Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften stereotaktisch inokulierter C6-Gliomzellen wurde für die vorliegende Studie dieses Modell gewählt.

4.3 Versuchstiere

Es wurden 40 weiblichen Wistar-Ratten im Alter von sechs Wochen jeweils 10^5 C6-Gliomzellen stereotaktisch implantiert. Dafür wurden vier randomisierte Therapiegruppen zu je 10 Tieren gebildet. Die drei Gruppen A, B und C wurden mit unterschiedlichen Dosierungen von H15[®] behandelt. Die Tiere der vierten Gruppe D bildeten die Kontrollgruppe. Ihnen wurde statt der H15[®]-Suspension oral NaCl-Lösung in gleicher Menge verabreicht. Die Ratten wurden zu je fünf Tieren pro Polykarbonatkäfig Typ 4 (Bodenfläche: 1815 cm², Höhe: 200 mm) bei einer Raumtemperatur von 22 °C gehalten. Die Haltung erfolgte im 12 Stunden Hell-/Dunkelrhythmus. Spezialfutter für Ratten und Trinkwasser standen ad libitum zur Verfügung. Zwei mal pro Woche wurden die Ratten umgesetzt. Die Tiergruppen wurden unter gleichen Bedingungen gehalten. Zu Beginn des Versuches wogen die Ratten zwischen 220 und 250 Gramm. Das Futterverhalten wurde täglich beobachtet und dokumentiert.

Für die Tierversuche lag eine Genehmigung der aufsichtsführenden Tierschutzbehörde beim Regierungspräsidium Gießen vor.

4.4 Herstellung der C6-Zellkulturen

Die verwendete Zelllinie entstammt dem ATCC (American Type Culture Collection). Das Nährmedium bestand aus 500 ml D-MEM Nährmedium, gemischt mit 50 ml fetalem Kälberserum (Gibco: 70270 - 106), 1 ml Penicillin/Streptomycin (PAA: P11 - 010) sowie 3 ml L-Glutamin (Gibco: 25030 - 024). Die Zellen wurden in Portionen von jeweils 10^6 Zellen zwischen Passage 68 und 77 in einem Nährmedium mit 10 % Dimethylsulfoxid in flüssigem Stickstoff eingefroren. Sie wurden fünf Tage vor Inokulation aufgetaut und in eine mit 20 ml Nährmedium gefüllte Kulturflasche gegeben. Anschließend wurden sie in einem Brutschrank bei 37 °C, unter 5 %-igem CO₂ und 95 %-iger Luftfeuchtigkeit inkubiert. Das Nährmedium wurde 24 Stunden nach dem Auftauen gewechselt. Abhängig vom Verlauf des Zellwachstums wurden die Zellen ab dem zweiten Tag passagiert. Hierfür wurde das Nährmedium entfernt und die verbliebene Zellsuspension mit Phosphat-Puffer gewaschen (POS, Gibco: 14040 - 091). Anschließend wurden die Zellen fünf Minuten mit Trypsin/EDTA (Gibco: 25300 - 054) versetzt, um sie vom Flaschenboden zu lösen. Die so entstandene Zellsuspension wurde in Zentrifugen-Röhrchen gefüllt. Pro Röhrchen wurden zusätzlich 20 ml Nährmedium zugegeben. Die Suspensionen wurden durchmischt und anschließend abzentrifugiert. Die Überstände wurden abgesaugt und die verbliebenen Zellsedimente in drei neue Kulturflaschen gegeben. Versetzt mit neuem Nährmedium, wurden die Zellen im Brutschrank erneut inkubiert. Zur Inokulation wurden nur Zellen zwischen Passage 72 und 88 verwendet.

Im letzten Schritt wurde das Nährmedium abgesaugt und die Zellen durch Zugabe von 2 ml Trypsin/EDTA vom Flaschenboden gelöst. Die entstandene Suspension wurde mit 13 ml Nährmedium versetzt, durchmischt und zentrifugiert. Die so gewonnenen Zellsedimente wurden mit 10 ml Medium resuspendiert. Aus dieser Suspension wurden 100 µl entnommen, mit 100 µl Trypanblau sowie 800 µl PBS (Phosphate Buffered Saline) vermischt und auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Auf diese Weise wurden die Zellzahl und die Vitalität der Zellen mikroskopisch bestimmt. Durch Zentrifugieren (5 min bei 1000 U/min) und Abtrennen des Überstandes wurden schließlich C6-Zellen gewonnen. Anschließend wurde PBS hinzu gegeben, um nach Durchmischung eine Zellsuspension von 2×10^4

Zellen pro Mikroliter zu erhalten. Von dieser Suspension wurden jeder Ratte 5 μ l (entsprechend 10^5 Zellen) inokuliert. Die verwendeten Reagenzien, die mit den Zellen in Kontakt kamen, wurden vor dem Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

4.5 Technik der Tumorzellimplantation

Die verwendeten Wistar-Ratten waren weiblich und wogen zwischen 220g und 250g. Die Versuchstiere wurden mit einer Dosis von 50 mg Phenobarbital/kg Körpergewicht narkotisiert. Danach wurden die Tiere in einem Stereotaxierahmen (Hersteller: David Kopf Instruments) fixiert (Abbildung 16). Am Rahmen ist zusätzlich ein Haltearm angebracht (Abbildung 16, Pfeil), der in den Ebenen X, Y und Z mittels Schrauben sehr präzise reguliert werden kann. An diesem Haltearm wird eine Hamilton-Spritze eingespannt und kann genau an den Applikationsort gesteuert werden.

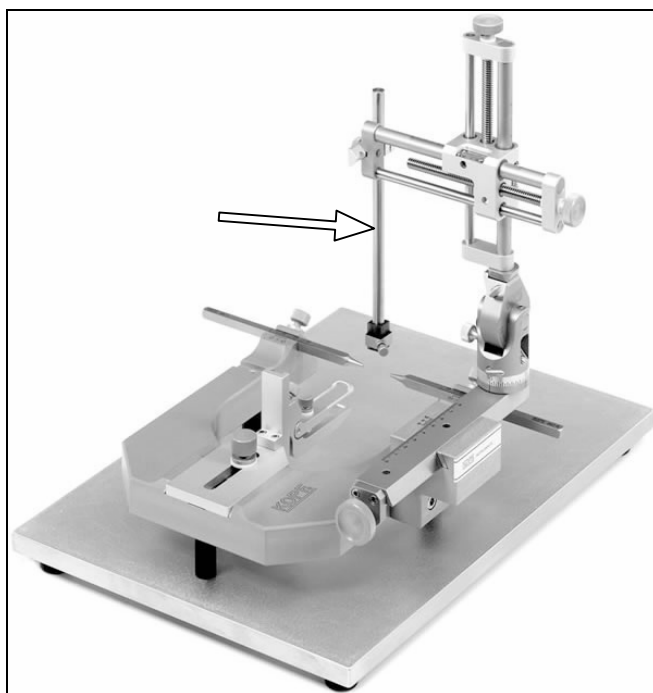


Abb. 16: Stereotaxierahmen. Haltearm für die Hamiltonspritze (Pfeil).

Nach dem Fixieren wurde die Kopfhaut der Versuchstiere rasiert und desinfiziert. Entlang der Mittellinie erfolgte ein 1 cm langer, sagittaler Hautschnitt. Die

Schädelkalotte wurde freipräpariert. Im Schädelknochen wurde unter sterilen Bedingungen mit einer Injektionskanüle der Stärke 0,4 mm ein Bohrloch gesetzt. Die Bohrung erfolgte 3 mm rechts lateral und 1 mm anterior des Bregmas (Breyer et al., 2000, Lee et al., 1988).

Die Injektionen wurden mit einer Hamilton-Spritzen (Hersteller: Hamilton, Schweiz; Abbildung 17) durchgeführt.



Abb. 17: Hamilton-Spritzen

Mit der Steuerungsschraube des Haltearms wurde die Spritze in das Bohrloch eingeführt. Nachdem eine Tiefe von 5 mm von der Tabula externa erreicht war, wurde der Inhalt von insgesamt 5 μ l C6-Tumorsuspension über einen Zeitraum von fünf Minuten injiziert. Nach der erfolgten Injektion der Tumorzellsuspension wurde die Spritze mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/min herausgezogen, um einen Rückfluss der verabreichten Zellen in den Nadeltrakt zu vermeiden. Nach Entfernung der Nadel wurde das Bohrloch mit Knochenwachs verschlossen und der subgaleale Raum mit steriler Kochsalzlösung sorgfältig gespült. Mit Silikonfaden der Stärke 3-0 und fortlaufender Naht wurde die Wunde verschlossen. Bis zum Abklingen der Narkose wurden sämtliche Tiere beobachtet. Erst nach Rückkehr der normalen Beweglichkeit und der normalen Orientierung wurden die Tiere in ihre ursprünglichen Gruppen zurückgebracht.

4.6 Applikation von H15[®]

Die Therapie der Versuchstiere begann am Tag nach Implantation mit dem Präparat H15[®]. Dabei handelte es sich um Tabletten, die jeweils 400 mg Trockenextrakt aus *Boswellia serrata* enthielten. Die Tabletten wurden vor der Anwendung mit einem Mörser zu Pulver zermahlen. Das abgewogene Pulver wurde unmittelbar vor der Verabreichung in jeweils 0,5 ml 0,9 % NaCl gelöst, um eine einfache orale Applikation und effektive Aufnahme zu erreichen. Den Tieren der unter 5.1 beschriebenen Gruppen wurde im 8-Stunden-Intervall H15[®] in den folgenden Dosierungen verabreicht:

- **Gruppe A:** 240 mg/kg Körpergewicht/Tag
- **Gruppe B:** 120 mg/kg Körpergewicht/Tag
- **Gruppe C:** 60 mg/kg Körpergewicht/Tag
- **Gruppe D:** Kontrollgruppe, Verabreichung von 0,5 ml 0,9 % NaCl-Lösung

Die Applikation wurde mit einer Schlundsonde durchgeführt. Dabei wurden die Ratten an ihrem Nackenhautmantel gegriffen und damit in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt. Dadurch konnte die Zellsuspension im vorderen Rachenabschnitt appliziert werden. Die Tiere verblieben kurz in der beschriebenen Position, um die Medikamentenaufnahme sicherzustellen. Erst danach wurden sie wieder zu ihrer Gruppe zurückgesetzt. Der Kontrollgruppe wurde auf die gleiche Art und Weise 0,5 ml 0,9 % NaCl-Lösung appliziert. Die Applikationen fanden zwischen 6:00 und 7:00 Uhr, 14:00 und 15:00 Uhr sowie 22:00 und 23:00 Uhr statt. Die Tiere wurden 14 Tage lang in der beschriebenen Art und Weise behandelt.

4.7 Vitalitätsanalyse und neurologischer Status

Das Verhalten der Tiere wurde während der Versuchsdauer beobachtet und täglich dokumentiert. Zur Beurteilung des neurologischen Status wurde eine Vierpunktklassifikationsskala verwendet (Winking et al., 2000). Als Referenzkriterium galt das Normalverhalten von gesunden Wistar Ratten. Die Vierpunktklassifikationsskala setzte sich aus folgenden Punkten zusammen:

- Fluchtreaktion
- Antrieb

- Neurologisches Defizit
- Aggressivität

Für jedes der bewerteten Kriterien wurden minimal ein Punkt und maximal vier Punkte vergeben. Ein gesundes Tier konnte demzufolge für jedes der vier Kriterien 4 Punkte erhalten, so dass eine maximale Punktzahl von 16 erreicht werden konnte. Tiere mit dem schlechtesten neurologischen Status konnten dagegen maximal 4 Punkte erreichen. In Tabelle 5 sind die Parameter zur Berechnung des Vitalitätsindex zusammengefasst.

Tab. 5: Parameter zur Berechnung des Vitalitätsindex.

Fluchtreaktion	Antrieb	Neurologisches Defizit	Aggressivität	Punktzahl
normal	normal	kein	normal	4
verspätet	Leicht verlangsamt	leicht	verspätet	3
verlangsamt	deutlich verlangsamt	mäßig	verlangsamt	2
keine	kein	stark	keine	1

- **Fluchtreaktion:** Zur Beurteilung der Fluchtreaktion wurden die Ausweichbewegungen der Tiere beim täglichen Herausnehmen aus dem Käfig herangezogen. Weiterhin wurde das Aufrichten der Ohren und des Oberkörpers, sowie das Beobachten der Umgebung bei Geräuschen bewertet.
- **Aggressivität:** Das Aggressionsverhalten gegenüber dem Menschen und innerhalb der Gruppe wurde beobachtet und bewertet. Die Tiere zeigten beim Versuch, sie aus dem Käfig zu nehmen ein Drohverhalten, indem sie das Nackenfell sträubten, den Kopf aufrichteten und das Maul öffneten. Weiterhin wurde das Beißverhalten der Tiere dokumentiert.
- **Antrieb:** Der Antrieb wurde anhand des Putzverhaltens und des Herumtobens der Tiere im Käfig bestimmt. Darüber hinaus wurde das Fressverhalten bewertet.
- **Neurologisches Defizit:** Zur Beurteilung eines neurologischen Defizits wurde das Gehverhalten der Tiere beobachtet. Es wurden Gangstörungen durch Mono- oder Hemiparesen, Paraplegien, Tetraplegien und Störungen der Atemmechanik dokumentiert. Weiterhin wurden Koordinationsstörungen bewertet.

Der Vitalitätsindex für jedes Tier wurde ab dem Tag der Tumorimplantation täglich um 23:00 Uhr ermittelt und dokumentiert. Alle Tiere wurden in gleicher Weise behandelt. Die Beurteilungen des Vitalitätsindex wurden von einem Beobachter durchgeführt.

4.8 Explantation des Gehirns

Nach der 14-tägigen Behandlung wurden die Tiere durch Inhalation von Äther euthanasiert. Um das Gehirn explantieren zu können, wurde die Kalotte der Versuchstiere unmittelbar nach Eintreten des Todes freipräpariert und eine Kraniektomie durchgeführt. Das nun sichtbare Gehirn wurde vom Hirnstamm und den Hirnnerven abgetrennt und im Ganzen extirpiert. Nach Entnahme wurden die Präparate sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur histologischen Aufbereitung bei -80 °C gelagert.

4.9 Bestimmung des Tumolvolumens

Anhand der HE gefärbten Schnitte wurde das Volumen der Tumoren unter Verwendung eines elektronischen Bildanalysesystems (MOP; Software: 3D-REC; Hersteller: Kontron AG, Eching) bestimmt. Dabei wurden zunächst die Tumorflächen der einzelnen Schnitte durch manuelles Umfahren der Tumorgrenzen mit einem Scannerstift erfasst. Das Bildanalysesystem berechnete auf Grundlage der eingescannten Tumorflächen und der Stärke der Schnitte das Volumen des Tumorgewebes in den einzelnen Schnitten. Durch Addition dieser Volumina errechnete das Bildanalysesystem schließlich das Volumen der Tumoren.

4.10 Bestimmung der Apoptose

Für die Bestimmung der Apoptoserate der Tumorzellen wurde als Antikörperfärbung das "In Situ Cell Death Detection Kit" (Hersteller: Boehringer, Mannheim) verwendet. Aus den histologischen Präparaten, die durch die HE-Färbung als tumortragend identifiziert wurden, wurden von jedem tumortragenden Rattenhirn insgesamt 9 Kryoschnitte des Tumorgewebes (jeweils 3 im vorderen, mittleren und

hinteren Drittel des Tumors) mit dieser Antikörperfärbung angefärbt. Der Abstand zwischen den einzelnen Schnitten betrug 15 µm.

Während der Apoptose entstehen DNA-Strangbrüche. Diese können für die Identifizierung apoptotischer Zellen verwendet werden. Das "In Situ Cell Death Detection Kit" identifiziert DNA-Strangbrüche durch enzymatische Markierung. Dabei werden freie 3'-OH-Enden der DNA mit fluoresceingekoppelten Nukleotiden markiert. Diese Reaktion wird durch das Enzym terminale Desoxynukleotidyl-Transferase katalysiert. Die Reaktion wird beschrieben als TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick End Labeling) oder als ISEL (In Situ End Labeling). Der Vorteil dieser Methode besteht in der Identifizierung jeder einzelnen apoptotischen Zelle in einer frühen Phase ihrer Apoptose. Es folgt die Inkubation mit Anti-Fluorescein-Antikörpern (Propidiumiodid), die mit alkalischer Phosphatase konjugiert sind. Propidiumiodid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der an Nukleinsäuren bindet und sowohl DNA als auch RNA anfärbt. Nach der Bindung steigt die Fluoreszenz auf das 20- bis 30-fache. Propidiumiodid kann die Zellmembran von apoptotischen Zellen passieren, jedoch nicht die von intakten Zellen. Nach der Reaktion mit Fast Red, welches als Substrat für die alkalische Phosphatase eingesetzt wird, erfolgt die Analyse im Lichtmikroskop. Das Absorptionsmaximum von Propidiumiodid liegt bei 535 nm und das Emissionsmaximum bei 617 nm. Die apoptotischen Zellen weisen einen deutlich rot gefärbten Kern auf.

In der vorliegenden Studie wurde die Anzahl der Tumorzellen mit DNA-Fragmentation und apoptotischen Zellkörpern nach der von Gavrieli et al. (1992) beschriebenen Methode in drei Gesichtsfeldern bei 200-facher Vergrößerung mikroskopisch identifiziert.

4.11 Datenanalyse und Auswertung

Quantitative Größen wurden anhand von Mittelwert und SEM (Standard Error of the Mean) dargestellt und mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft. Entsprechend wurden zwei abhängige Stichproben bei Normalverteilung mit dem t-Test für paarige Stichproben verglichen. Bei signifikanter Abweichung von einer Normalverteilung wurde anstelle des t-Tests der Wilcoxon-Test für Paardifferenzen eingesetzt.

Ordinal skalierte Größen wurden anhand von absoluten und prozentualen Häufigkeiten beschrieben und paarweise in Kontingenztafeln gegenübergestellt. Mittels Chi-Quadrat-Test bzw. Exaktem Test nach Fisher bei zu kleinen erwarteten Häufigkeiten wurden zwei gegenübergestellte Merkmale auf Abhängigkeit geprüft. Die statistische Analyse erfolgte mit SPSS für Windows Version 16 (SPSS Inc., USA).

5 Ergebnisse

5.1 Vitalität

5.1.1 Vitalitätsindex vor Tumorimplantation

Vor Studienbeginn wiesen alle Tiere einen Vitalitätsindex von 16 auf. Es waren keine Auffälligkeiten bei der Fluchtreaktion, der Aggressivität, der Schnelligkeit oder der Neurologie zu beobachten. Am Tag der Tumorimplantation kam es aufgrund der Narkose und als Folge des Eingriffs zu einer temporären Herabsetzung der Vitalität. Die Tiere erholten sich jedoch rasch wieder und zeigten keine Residuen.

5.1.2 Vitalitätsindex 7 Tage nach Tumorimplantation

In den ersten 7 Tagen nach Tumorimplantation wurden keine Verschlechterungen des Vitalitätsindex beobachtet. Der Vitalitätsindex betrug in allen vier Gruppen 16.

5.1.3 Vitalitätsindex vom 8. bis 14. Tag nach Tumorimplantation

Ab dem 8. Tag nach Tumorimplantation konnte ein Abfall des Vitalitätsindex festgestellt werden. Es kam zu einer deutlichen Einschränkung der Vitalität bei Fluchtreaktion (Abb. 18), Antrieb (Abb. 20) und Aggressivität (Abb. 22). Neurologische Defizite wurden in allen vier Behandlungsgruppen bis zum 12. Tag nicht beobachtet.

5.1.3.1 Fluchtreaktion

Abbildung 18 zeigt eine Verschlechterung der Fluchtreaktion bereits ab dem 8. Tag nach Tumorimplantation in der Kontrollgruppe D und in der Behandlungsgruppe C. Ab dem 9. Tag ist eine Verschlechterung auch in der Behandlungsgruppe B festzustellen, ab dem 10. Tag auch in der Behandlungsgruppe A. Ab dem 10. Behandlungstag setzen sich die Gruppen A und B signifikant von den Gruppen C und D ab ($p < 0,001$).



Abb. 18: Entwicklung des Vitalitätsindex bezogen auf die Fluchreaktion vom 8. bis 14. Tag in den Behandlungsgruppen A, B, C und D. (Anteile der Versuchstiere mit den Parametern 2, 3 und 4 in Prozent; Parameter 2: Fluchreaktion verlangsamt, Parameter 3: Fluchreaktion verspätet, Parameter 4: Fluchreaktion normal).

Der Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen A und B einerseits und C und D andererseits wird nach 14-tägiger Behandlung noch deutlicher, wie Abbildung 18 zeigt. Wie deutlich sich die Unterschiede in der Fluchreaktion ab dem 10. Behandlungstag entwickeln, zeigt Übersichtsgrafik 19. Kontrollgruppe D und Behandlungsgruppe C mit der niedrigsten Dosierung von 60 mg/kg KG zeigen während der gesamten Behandlungsdauer keine signifikanten Unterschiede in der Fluchreaktion. Die Kurven beider Behandlungsgruppen sind nahezu deckungsgleich und zeigen eine deutliche Abnahme des Vitalitätsindex in Bezug auf die

Fluchtreaktion. Auch Behandlungsgruppe B zeigt einen kontinuierlichen Abfall des Vitalitätsindex, nähert sich jedoch nicht der Kontrollgruppe D und der Behandlungsgruppe C. Einen grundlegend anderen Verlauf zeigt die Behandlungsgruppe A mit der höchsten Dosierung mit 240 mg/kg KG. Bis zum 12. Behandlungstag kommt es, wie in den anderen Behandlungsgruppen, zu einem Abfall des Vitalitätsindex. Danach stagniert der Vitalitätsindex jedoch. Am 14. Tag zeigen die Tiere sogar eine Verbesserung der Fluchtreaktion.

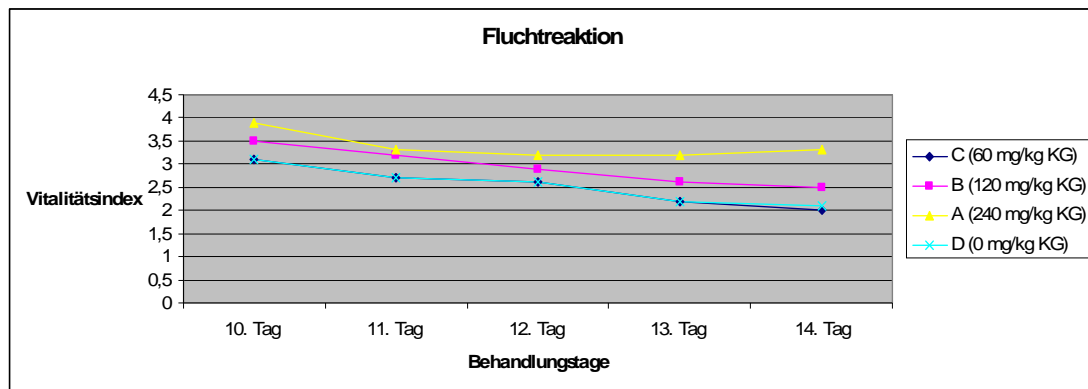


Abb. 19: Veränderung des Vitalitätsindexes in den Behandlungsgruppen A, B, C und D ab dem 10. Behandlungstag in Bezug auf die Fluchtreaktion.

5.1.3.2 Antrieb

Die Tiere in der Kontrollgruppe D und der Behandlungsgruppe C zeigen bereits ab dem 8. Behandlungstag eine Abnahme des Antriebs, wie in Abbildung 20 dargestellt. Es ist eine signifikante Abweichung zwischen den Gruppen A und B und den Gruppen C und D am 10. Behandlungstag festzustellen ($p < 0,001$). In den Behandlungstagen 11 bis 14 ist eine Abnahme des Antriebs auch in den Behandlungsgruppen A und B zu beobachten. Nach 14-tägiger Behandlung setzt sich die Behandlungsgruppe A signifikant von den anderen Behandlungsgruppen ab ($p < 0,001$). In dieser Gruppe zeigen 30 % der behandelten Tiere keine Verschlechterung. Bei 70 % der Tiere fällt der Vitalitätsindex in Bezug auf den Antrieb um einen Punkt ab.



Abb. 20: Entwicklung des Vitalitätsindex bezogen auf den Antrieb vom 8. bis 14. Tag in den Behandlungsgruppen A, B, C und D. (Anteile der Versuchstiere mit den Parametern 2, 3 und 4 in Prozent; Parameter 2: Antrieb deutlich verlangsamt, Parameter 3: Antrieb leicht verlangsamt, Parameter 4: Antrieb normal).

Wie Abbildung 21 zeigt, weisen die Kontrollgruppe D und die Behandlungsgruppe C mit 60 mg/kg KG weisen eine ähnliche Entwicklung des Vitalitätsindex auf. Die Kurven der beiden Behandlungsgruppen sind nahezu identisch. Der Vitalitätsindex der Behandlungsgruppe B ist bis zum 13. Behandlungstag signifikant besser als die Kontrollgruppe D ($p < 0,001$), fällt jedoch am 14. Behandlungstag auf das Niveau der Behandlungsgruppen D und C ab. An diesem Behandlungstag sind die Werte der Gruppen B, C und D identisch. Der Antrieb in der Gruppe A sinkt bis zum

12. Behandlungstag zunächst leicht, liegt am 14. Tag aber wieder auf dem Niveau des 11. Behandlungstages.

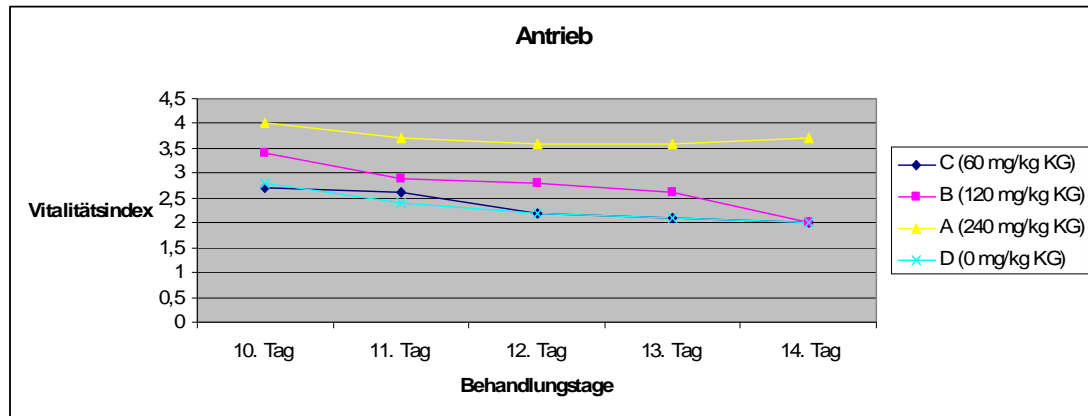


Abb. 21: Veränderung des Vitalitätsindex in den Behandlungsgruppen A, B, C und D vom 10. bis 14. Tag in Bezug auf den Antrieb.

5.1.3.3 Aggressivität

Die Tiere in der Kontrollgruppe D und in der Behandlungsgruppe C zeigen bereits ab dem 8. Behandlungstag eine herabgesetzte Aggressivität, wie in Abbildung 22 dargestellt. Ab dem 10. Behandlungstag ist eine signifikante Abnahme der Aggressivität in den Gruppen B, C und D im Vergleich zur Gruppe A festzustellen ($p < 0,001$). Die Tiere der Behandlungsgruppe A weisen am 10. Behandlungstag immer noch einen Vitalitätsindex von 4 für das Merkmal Aggressivität auf.

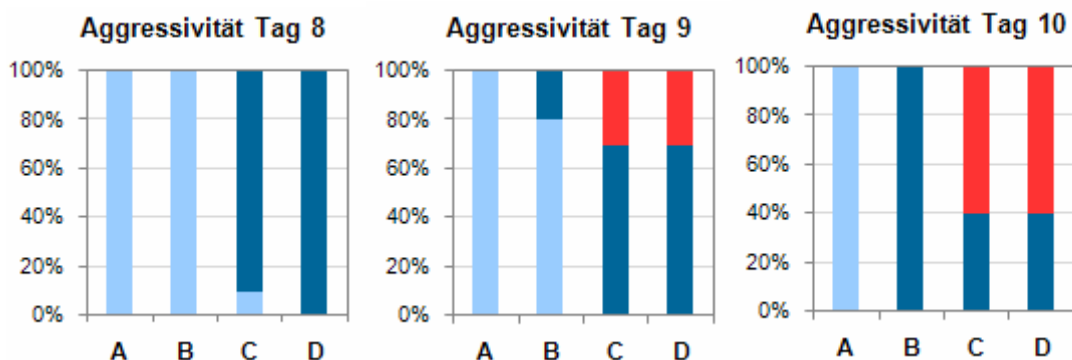




Abb. 22: Entwicklung des Vitalitätsindex bezogen auf die Aggressivität vom 8. bis 14. Tag in den Behandlungsgruppen A, B, C und D. (Anteile der Versuchstiere mit den Parametern 2, 3 und 4 in Prozent; Parameter 2: Aggressivität verlangsamt, Parameter 3: Aggressivität verspätet, Parameter 4: Aggressivität normal).

Wie Abbildung 23 zeigt, nimmt an den Behandlungstagen 10 bis 13 in allen Gruppen die Aggressivität ab. In der Gruppe A sinkt sie um einen Punkt, bleibt jedoch ab dem 12. Behandlungstag weitgehend konstant bei einem Vitalitätsindex von 3. In der Kontrollgruppe D und in der Behandlungsgruppe C mit der geringsten Dosierung ist der Verlauf des Vitalitätsindex zwischen dem 10. und dem 14. Tag nahezu identisch. Behandlungsgruppe B zeigt zunächst einen signifikant verschiedenen Vitalitätsindex zu diesen beiden Behandlungsgruppen ($p < 0,001$). Zwischen dem 12. und dem 13. Behandlungstag nähert er sich jedoch dem Vitalitätsindex der Gruppen D und C an und ist danach identisch. Am 14. Behandlungstag unterscheiden sich die Gruppen B, C, und D signifikant von der Gruppe A ($p < 0,001$).

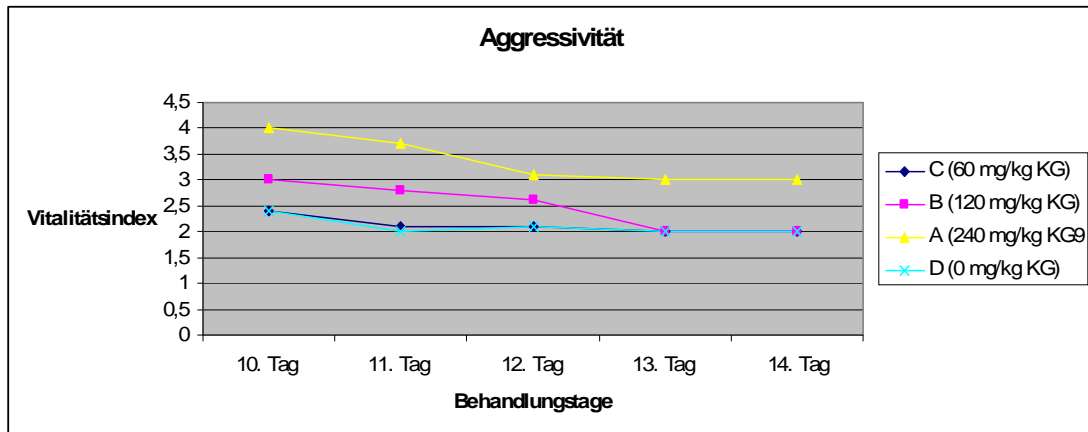


Abb. 23: Veränderung des Vitalitätsindexes in den Behandlungsgruppen A, B, C und D vom 10. bis 14. Tag in Bezug auf die Aggressivität.

5.1.3.4 Neurologisches Defizit

In den ersten 11 Behandlungstagen sind in allen Behandlungsgruppen keine neurologischen Defizite zu beobachten. Am 12. Behandlungstag zeigen sich in den Behandlungsgruppen B, C, und D leichte Defizite bei maximal 20 % der Tiere, wie Abbildung 24 zeigt. Am 13. Tag steigt der Anteil der Tiere mit leichten neurologischen Defiziten in diesen Gruppen auf maximal 40 %, am 14. Tag auf maximal 50 %.

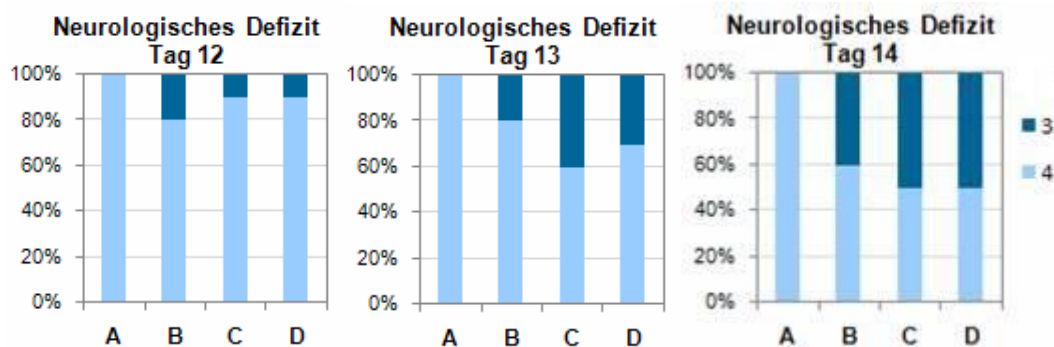


Abb. 24: Entwicklung des Vitalitätsindex bezogen auf neurologische Defizite am 12., 13. und 14. Tag in den Behandlungsgruppen A, B, C und D (Anteile der Versuchstiere mit den Parametern 3 und 4 in Prozent; Parameter 3: leichtes neurologisches Defizit, Parameter 4: kein neurologisches Defizit).

Über die gesamte Behandlungsdauer sind in Gruppe A keine neurologischen Defizite festzustellen. Wie die Übersichtsabbildung 25 zeigt, nehmen die neurologischen Defizite in den anderen drei Gruppen ab dem 11. Tag jedoch zu und unterscheiden sich am 14. Tag signifikant von Gruppe A ($p = 0,026$). Auffällig ist, dass sich der Vitalitätsindex in der Behandlungsgruppe B zunächst stärker verschlechtert als in den Behandlungsgruppen C und D. Erst ab dem 13. Behandlungstag liegt der Vitalitätsindex der Behandlungsgruppe B höher als der Vitalitätsindex der Behandlungsgruppen C und D.

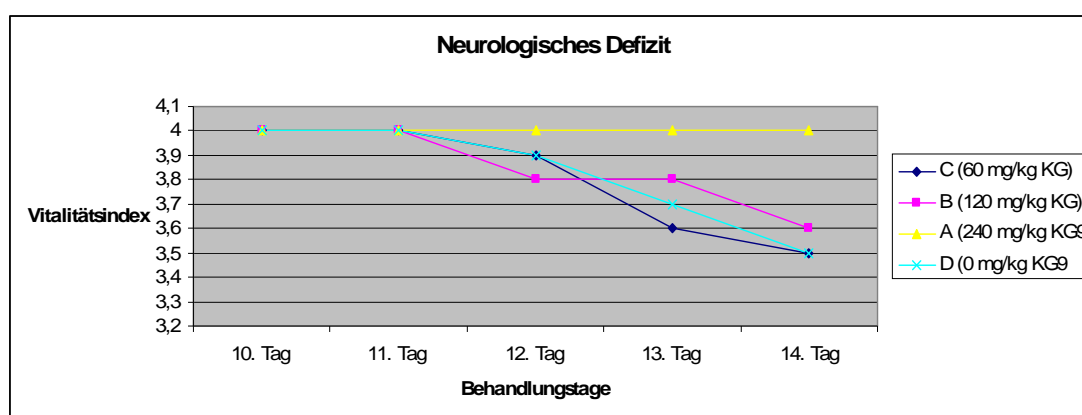


Abb. 25: Veränderung des Vitalitätsindexes in den Behandlungsgruppen A, B, C und D vom 10. bis 14. Tag in Bezug auf die neurologischen Defizite.

5.1.3.5 Gesamtvitalitätsindex

Unter Einbeziehung der vier bewerteten Vitalitätskriterien Fluchtreaktion, Antrieb, Aggressivität und neurologisches Defizit wurde ein Gesamtvitalitätsindex gebildet. Hierzu wurden die Vitalitätsindizes der vier Parameter für jedes einzelne Tier addiert. Darauf basierend, wurden für die Gruppen A, B, C und D Mittelwerte gebildet. Wie Abbildung 26 zeigt, weicht der Gesamtvitalitätsindex der Gruppe A am 14. Behandlungstag signifikant ($p < 0,05$) vom Gesamtvitalitätsindex der Gruppen B, C und D ab. Die Werte der Behandlungsgruppe B sowie der Gruppen C und D sind zunächst noch signifikant verschieden ($p < 0,05$), nähern sich jedoch bis zum 14. Behandlungstag an und sind dann nahezu identisch. Auch in Behandlungsgruppe A fällt der Gesamtvitalitätsindex bis zum 12. Behandlungstag ab. Ab dem 12. Tag

bleibt der Wert konstant, während es in den anderen Gruppen zu einer Verschlechterung kommt.

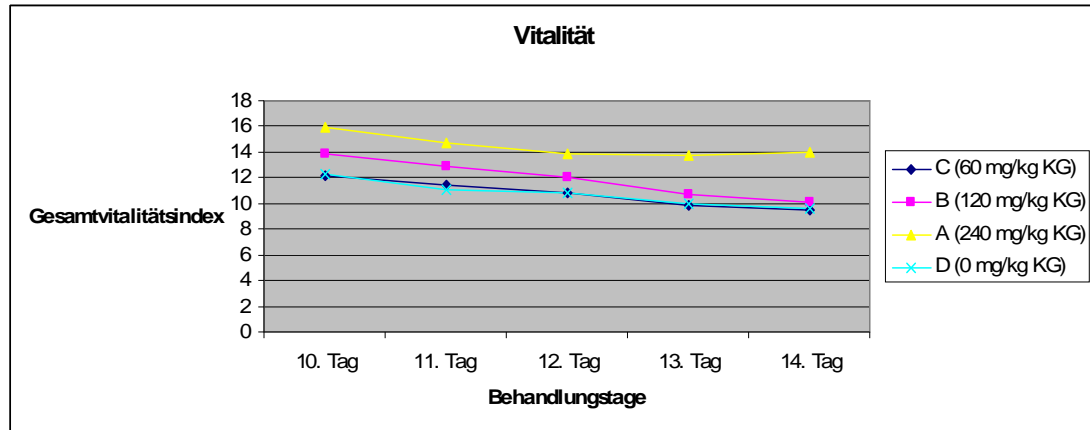


Abb. 26: Veränderung des Gesamtvitalitätsindex vom 10. bis 14. Tag in den Behandlungsgruppen A, B, C und D.

5.2 Beobachtete Nebenwirkungen

Das Medikament wurde von den Tieren gut vertragen. Als einzige Nebenwirkung wurde bei den Tieren der Gruppe A ein leichter Haarausfall festgestellt.

5.3 Tumorwachstum

Die entnommenen Gehirne wurden mikroskopisch auf Tumorwachstum untersucht. Es zeigte sich ein gutes Anwachsen der Tumoren in allen Hirnen. Die räumliche Tumorausdehnung nahm in den Behandlungsgruppen mit 120 und 240 mg/kg Körpergewicht deutlich ab. Hier waren lediglich kleine Anhäufungen von wenigen Gliomzellen entlang des durch die Tumorzellimplantation entstandenen Einstichkanals festzustellen. In drei Fällen wurden Tumorzellhaufen sowohl am obersten Punkt der Einstichstelle als auch entlang des Einstichkanals beobachtet (Abbildung 28). Die Kontrollgruppe D sowie die Gruppe C (60 mg/kg KG) zeigten die größten Tumorumfänge. Aufgrund des raumfordernden Wachstums kam es in diesen beiden Gruppen zu ausgeprägten Verschiebungen der Mittellinie (Abbildung 27).

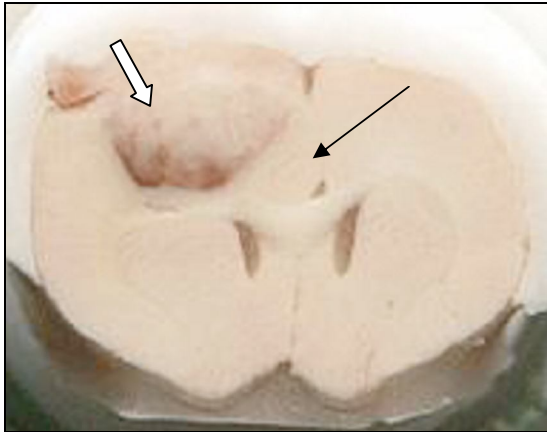


Abb. 27: Gehirnschnitt, koronare Schnittebene, Vergrößerung 1:5; mikroskopische Ansicht von rostral in der Behandlungsgruppe C (60 mg/kg KG). Sichtbar ist ein großes Tumorareal in der rechten Hemisphäre (weißer Pfeil). Es ist zu einer Mittellinienverlagerung nach links gekommen (schwarzer Pfeil).

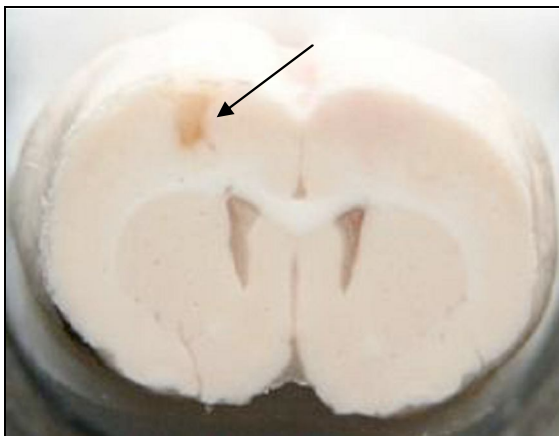


Abb. 28: Gehirnschnitt, koronare Schnittebene, Vergrößerung 1:5; Ansicht von rostral der Behandlungsgruppe A (240 mg/kg KG). Sichtbar ist ein kleines Tumorareal (Pfeil).

In den HE-Präparaten der Tumoren zeigten sich zentrale Nekrosen. Weiterhin wiesen die Neoplasien eine periphere pathologische Gefäßneubildung mit Einblutungen auf (Abbildung 29).

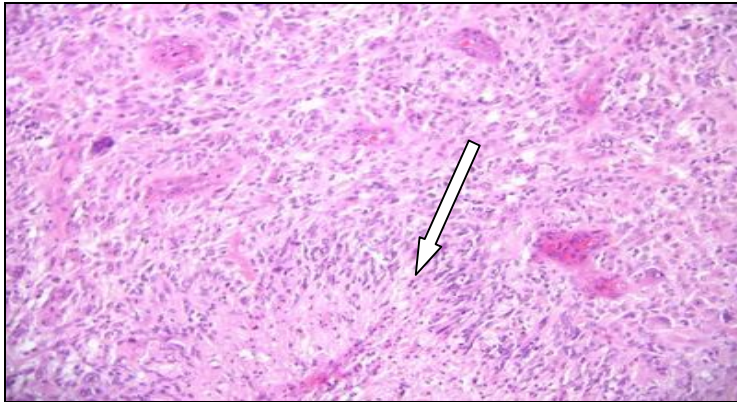


Abb. 29: H&E Präparat (x200) eines Gehirnschnittes aus der Kontrollgruppe D. Darstellung eines zellichten Tumors mit erhöhter Mitoseaktivität und typischer glomerulumartiger Gefäßproliferate. Der Pfeil markiert die Tumornekrose mit Pseudopalisadenformationen der angrenzenden Tumorzellen.

5.4 Tumorumfolumen

Die computergestützte Bildanalyse der Tumorumfolumina zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe D und der Behandlungsgruppe B (120 mg/kg KG) sowie der Behandlungsgruppe A (240 mg/kg KG) ($p < 0,05$). Wie Abbildung 30 zeigt, verringerte sich das Tumorumfolumen mit steigender H15[®]-Dosis.

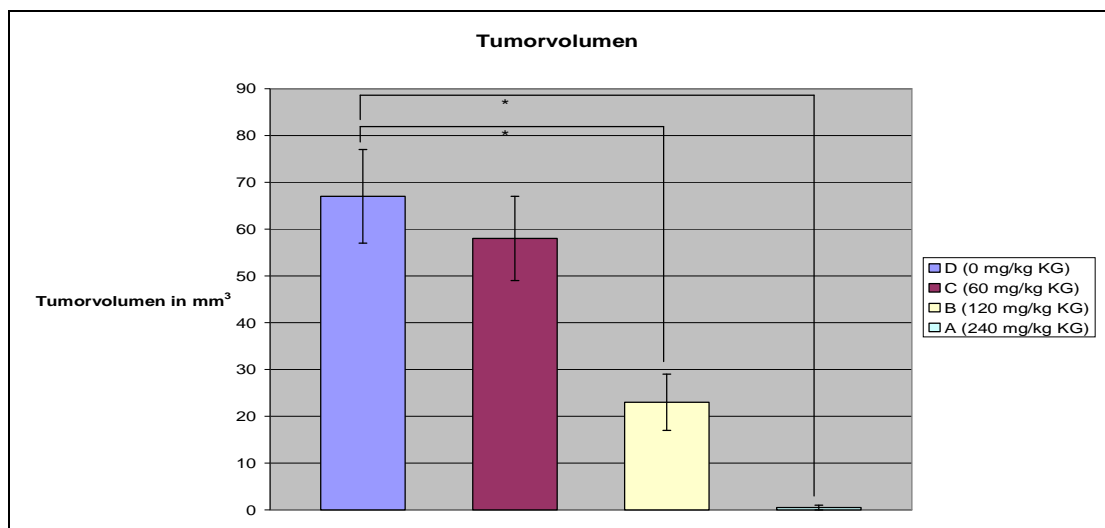


Abb. 30: Tumorumfolumen in den Behandlungsgruppen A (240 mg/kg KG), B (120 mg/kg KG), C (60 mg/kg KG) und D (0 mg/kg KG) nach C6-Zellimplantation und 14-tägiger Behandlung mit H15[®], $n = 10$ pro Untergruppe (* $p < 0,05$).

Bei Tieren der Kontrollgruppe D betrug das arithmetische Mittel der Tumorumfänge $67 \pm 1 \text{ mm}^3$, bei der Gruppe C (60 mg/kg KG) $58 \pm 0,9 \text{ mm}^3$ und bei der Behandlungsgruppe B (120 mg/kg KG) $23 \pm 0,6 \text{ mm}^3$. Wie unter 5.3 erläutert, waren bei den Tieren der Behandlungsgruppe A (240 mg/kg KG) lediglich kleine Anhäufungen von Gliomzellen entlang des Einstichkanals festzustellen (siehe Abbildung 28).

5.5 Apoptose

Die Zahl der apoptotischen Zellen pro Gesichtsfeld wurde mit der unter 5.12 beschriebenen Methode bestimmt. Wie in Abbildung 31 dargestellt, betrug sie bei der Kontrollgruppe D im Mittel $13,2 \pm 1,7$, in der Behandlungsgruppe C (60 mg/kg KG) im Mittel $19,9 \pm 1,4$, in der Behandlungsgruppe B (120 mg/kg KG) im Mittel $27,3 \pm 1,5$ und in der Gruppe A (240 mg/kg KG) im Mittel $32,7 \pm 1,4$. Diese Ergebnisse zeigen eine signifikante Induktion von Apoptose durch H15[®] in der Behandlungsgruppe A mit der höchsten Medikamentendosis im Vergleich zur Kontrollgruppe D ($p < 0,05$).

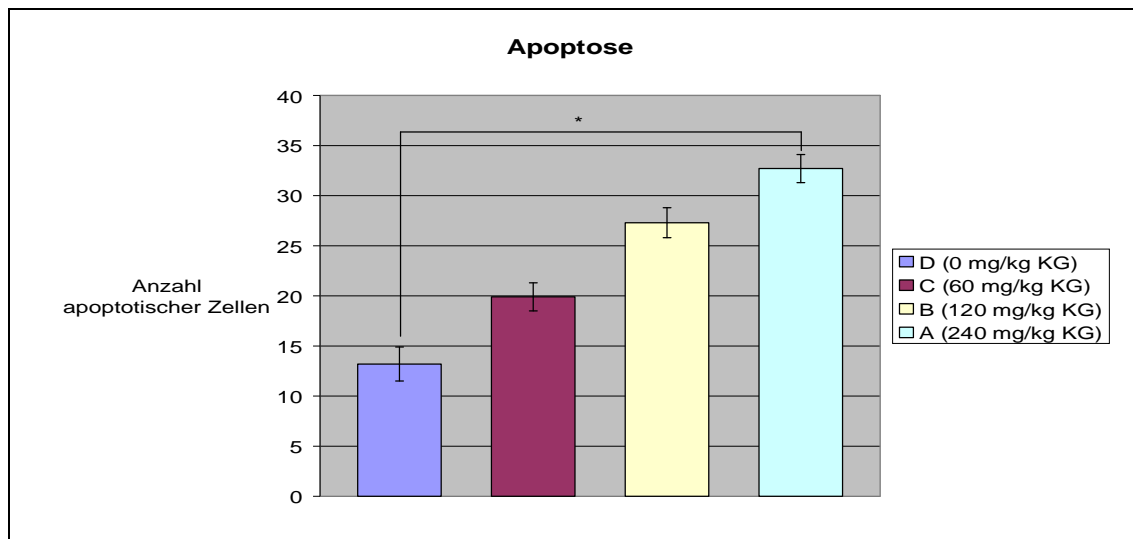


Abb. 31: Anzahl apoptotischer C6-Gliomzellen in den Behandlungsgruppen A (240 mg/kg KG), B (120 mg/kg KG), C (60 mg/kg KG) und D (0 mg/kg KG) nach 14-tägiger Behandlung mit H15[®], n = 10 pro Untergruppe (* $p < 0,05$).

6 Diskussion

Die Entstehung lokaler Tumorrezidive stellt in der Neuroonkologie trotz beachtlicher Fortschritte in der bildgebenden Diagnostik, der mikrochirurgischen Operationstechnik und der kombinierten Radio-/Chemotherapie ein großes Problem dar. Aufgrund des infiltrativen Wachstums von malignen Hirntumoren und der Eigenschaft von Gliomzellen, durch gesunde neuronale Zellverbände zu migrieren, scheinen systemische Chemotherapeutika ein Erfolg versprechendes Zusatztherapeutikum in der Behandlung von malignen Gliomen zu sein.

Die vorliegende Studie untersucht, ob das Weihrauchextrakt H15[®] als ein solches Zusatzchemotherapeutikum geeignet ist. Es wird die Einsatzmöglichkeit von H15[®] in der prophylaktischen Therapie zur Verhinderung von Rezidiven nach Tumoresektion untersucht. Im Mittelpunkt der Betrachtung stehen dabei der Einfluss von H15[®] auf das peritumorale Ödem, auf das Tumorstadium und die Induktion von Apoptose. Durch den gewählten Versuchsansatz wird der übliche Patient mit einem Glioblastoma multiforme direkt nach operativer Tumorextirpation simuliert. Der Zustand nach Tumoresektion mit mikroskopisch nicht sichtbaren, invasiv wachsenden und in situ verbliebenen Tumorzellen am Patienten wird durch Injektion von C6-Zellen in gesundes Hirngewebe von weiblichen Wistar-Ratten dargestellt.

6.1 Eignung des C6-Gliom Tumormodells

Das C6-Gliom Tumormodell der Ratte ist ein etabliertes Verfahren zur Evaluierung von neuen Therapieformen bei malignen Gliomen (Breyer et al., 2000; Lee et al., 1988; Maron et al., 1996). Die mikroskopische Betrachtung der C6-Gliome belegt den invasiven Charakter dieser Zelllinie mit nachweisbarer Infiltration, Ödem- und Nekrosebildung (Goldbrunner et al., 2004). Folglich stellt es ein geeignetes Modell zur Beantwortung spezifischer, neuroonkologischer Fragestellungen dar. Die Abstammung der C6-Zelllinie ist ein wesentlicher Nachteil des Tumormodells. Da die C6-Zelllinie aus einer Outbred-Züchtung stammt, stehen keine gen-identischen Wirte zur Verfügung. Somit kann der Tumor in allogenen Wirten eine Immunreaktion auslösen. Das führt zu einer starken Limitierung der Einsetzbarkeit dieser Zelllinie in

Studien, bei denen das Überleben des Wirtes den Endpunkt bildet. In der vorliegenden Studie ist nach 14-tägiger Behandlungsdauer der Endpunkt erreicht. Eine mögliche Immunreaktion im allogenen Wirt durch den Tumor wird durch die begrenzte Studiendauer limitiert, so dass dieser Aspekt vernachlässigt werden kann.

6.2 Vor- und Nachteile des Phytotherapeutikums H15[®]

Das Zusammenwirken der verschiedenen Inhaltsstoffe von Phytopharmaka wird für ihre Wirksamkeit und ihre Verträglichkeit verantwortlich gemacht (Teuscher 1997). Im Weihrauchextrakt H15[®] liegt ein Gemisch verschiedenster Substanzen vor, darunter unterschiedliche Derivate der Boswelliasäuren. Gemäß der Lehre der Phytotherapie ist es das Zusammenwirken dieser Boswelliasäurederivate, das die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Wirkungen verursacht. Allerdings könnte das Zusammenspiel der verschiedenen Boswelliasäuren auch eine Schwäche des Weihrauchextraktes H15[®] sein, da sich die Wirkung der Inhaltsstoffe teilweise gegenseitig aufhebt. Boswelliasäuren beeinflussen als allosterische Regulatoren unmittelbar die Aktivität des Enzyms 5-Lipoxygenase (Sailer et al., 1998). Das pentazyklische Grundgerüst der Triterpene ist die Voraussetzung für die Bindung der Boswelliasäuren an die 5-Lipoxygenase. Für eine komplette intrinsische Hemmung der 5-Lipoxygenase ist zusätzlich eine hydrophile Gruppe am C-Atom und die 11-keto-Funktion erforderlich (Sailer et al., 1996). Die unterschiedlichen Grundgerüste in den Strukturformeln der Boswelliasäuren haben unterschiedliche Wirksamkeiten zur Folge. Partielle Inhibitoren sind die pentazyklischen Triterpenverbindungen ohne 11-keto-Funktion. Dazu gehören die Acetyl- β -Boswelliasäure und die β -Boswelliasäure (Sailer et al., 1996). Der potenteste Inhibitor der 5-Lipoxygenase ist die Acetyl-11-keto- β -Boswelliasäure, die sowohl die hydrophile Gruppe am C4-Atom als auch die 11-keto-Funktion aufweist (Safayhi et al., 1992). Konkurrieren die pentazyklische Triterpenverbindungen ohne 11-keto-Funktion mit Acetyl-11-keto- β -Boswelliasäure, kann es zu einer Antagonisierung der inhibitorischen Wirkung kommen. Beispielsweise wird die inhibitorische Wirkung von Acetyl-11-keto- β -Boswelliasäure durch β -Boswelliasäure partiell aufgehoben (Sailer et al., 1996; Schweizer et al., 2000). Verschiedene handelsübliche Weihrauchextrakte zeigten sowohl stimulierende als auch hemmende Effekte auf die 5-Lipoxygenase (Safayhi et

al., 2000; Krieglstein et al., 2001). Dafür ist unter anderem das tetracyclische Triterpen 3-oxo-Tirucalisäure verantwortlich, das die Leukotriensynthese steigern kann (Krieglstein et al., 2001). Die aufgezeigten Analysen zeigen, dass die Inhaltsstoffe von Phytopharmaka großen Schwankungen unterliegen können. Eine Standardisierung der verwendeten Extrakte ist essentiell, um diese Schwankungen so gering wie möglich zu halten. Durch HPLC- und Dünnschichtchromatographien konnte gezeigt werden, dass das Trockenextrakt H15[®] aus *Boswellia serrata* einen weitgehend konstanten Boswelliasäure-Gehalt über viele Chargen hinweg aufweist (Ennet et al., 2000).

Trotz Standardisierung bleibt das Extrakt jedoch ein Gemisch, das auch Wirkstoffe enthält, die die Leukotriensynthese steigern. Ein vielversprechender Ansatz ist deshalb die Verwendung von Acetyl-11-keto- β -Boswelliasäure oder 11-keto- β -Boswelliasäure in Reinform. Sie sind die wirksamsten Bestandteile des Weihrauchextraktes. In einer tierexperimentellen Studie wurde der Einfluss von H15[®] bzw. daraus isoliertem β -AKBA auf Ileitis bei Ratten untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die orale Gabe von H15[®] und β -AKBA dosisabhängig die mit der Ileitis verbundenen Entzündungsreaktionen signifikant reduziert. Die Entzündungsreaktion des Darmgewebes wurde durch hohe Dosen von H15[®] signifikant vermindert. Bei β -AKBA wurde das gleiche Ergebnis sowohl durch die Gabe von niedrigen als auch hohen Dosen erzielt (Krieglstein et al., 2001). In einer weiteren Studie wurde die Wirkung von β -AKBA auf menschliche Meningeomzellkulturen untersucht. Hier zeigte sich ein zytotoxischer Effekt durch Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion. Diese Wirkung wurde auf eine Hemmung der Phosphorylierung der mitogen aktivierten Proteinkinasen Erk-1 und Erk-2 zurückgeführt (Park et al., 2002). Den mitogen aktivierten Proteinkinasen kommt eine bedeutende Rolle auch in anderen humanen Neoplasien zu. Die Hemmung dieses Signalwegs durch β -AKBA könnte ein weiterer Mechanismus in der Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion sein. In einer weiteren Studie konnte eine starke Hemmung des Wachstums von Prostata Tumoren durch die Verabreichung von β -AKBA nachgewiesen werden. Es wurden in einem Xenograft Mausmodell zunächst Prostata Tumoren implantiert. Nach dem Anwachsen der Tumoren auf ca. 100 mm³ wurde den Versuchstieren 30 Tage lang subcutan 10 mg/KG/d β -AKBA verabreicht. Die Tumoren der mit β -AKBA behandelten

Versuchstiere waren signifikant kleiner als die der Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis konnte auf eine Hemmung der VEGFR-2 vermittelten Tumorangiogenese zurückgeführt werden (Pang et al., 2009). Die oben genannten Studien zeigen, dass die Reinsubstanz β -AKBA wie auch H15[®] antiinflammatorische, antiproliferative und Apoptose induzierende Wirkung hat. Die Untersuchungen von KRIEGLSTEIN zeigen weiterhin, dass β -AKBA als Reinsubstanz in seiner antiinflammatorischen Wirkung dem Wirkstoffgemisch H15[®] überlegen sein könnte (Kriegelstein et al., 2001). Zur Klärung der Frage, ob auch die antiproliferativen und apoptotischen Eigenschaften von β -AKBA denen von H15[®] überlegen sind, sind weitere Untersuchungen nötig.

6.3 Pharmakokinetik der Boswelliasäuren

Ein entscheidender Aspekt der Behandlung mit H15[®] ist die Frage, in welchem Umfang die verabreichten Wirkstoffe nach der oralen Applikation vom Körper resorbiert werden. Im Mittelpunkt der Betrachtung stehen dabei die Boswelliasäuren β -KBA und β -AKBA. Sie wurden als die Boswelliasäuren mit der stärksten Wirkung identifiziert, da sie für die selektive, nicht-Redox vermittelte Inhibierung der 5-Lipoxygenase verantwortlich sind (Safayhi et al., 1992).

In späteren Studien wurde die Pharmakokinetik dieser Boswelliasäuren am Menschen näher untersucht. Es wurden im Blutplasma niedrige Konzentrationen von Boswelliasäuren nachgewiesen (Abdel Tawab et al., 2001; Buechele und Simmet, 2003; Sharma et al., 2004). Die in vitro IC₅₀ Werte für die 5-Lipoxygenase Inhibierung von β -KBA und β -AKBA betrugen 2,8 respektive 1,5 μ M. Die Plasmakonzentrationen von β -KBA überschritten nicht den Wert von 2 μ M nach der einmaligen Einnahme von 1600 mg H15[®]. In sämtlichen Studien mit einmaliger Gabe von H15[®] konnte kein β -AKBA im Plasma nachgewiesen werden. Nach der täglichen Einnahme von 4 x 786 mg H15[®] über einen Zeitraum von 10 Tagen wurde dagegen eine Plasmakonzentration von 0,1 μ M β -AKBA nachgewiesen (Buechele und Simmet, 2003). Auch im Tierversuch konnten im Blutplasma nur geringe Konzentrationen von β -KBA und β -AKBA nachgewiesen werden. Im Plasma von Ratten wurde nach einmaliger Gabe von 240 mg/kg KG H15[®] eine Konzentration von 0,4 μ M β -KBA und 0,2 μ M β -AKBA gemessen (Reising et al., 2005).

Sowohl ein ausgeprägter Metabolismus als auch eine mangelhafte Resorption könnten die Ursachen für die begrenzte systemische Verfügbarkeit dieser stark wirksamen Boswelliasäuren sein. Die Rolle des hepatischen Metabolismus wurde in vitro an Lebermikrosomen und Hepatozyten von Ratten, sowie an humanen Lebermikrosomen untersucht (Krüger et al., 2008). Es konnte gezeigt werden, dass β -KBA einem extensiven Phase-1 Metabolismus unterliegt, während β -AKBA metabolisch stabil ist. Weiterhin belegte die Studie, dass β -AKBA nicht zu β -KBA acetyliert wird. In Anbetracht dieser Ergebnisse sind die niedrigen nachgewiesenen Plasmakonzentrationen von β -AKBA überraschend, da β -AKBA sehr lipophil ist und deshalb leicht resorbierbar sein sollte.

Es wird davon ausgegangen, dass lipophile Bestandteile mit einer höheren Rate durch die zellulären Membranen des intestinalen Epitheliums, das die wichtigste Barriere für oral verabreichte Wirkstoffe darstellt, diffundieren. Krüger et al. zeigten jedoch, dass auch lipophile pentazyklische Triterpene, wie β -KBA und β -AKBA, nur mit einer verminderten Rate humane Kolon-Adenokarzinom-Zelllinien (Caco-2 Monolayer) passieren. Caco-2 Zelllinien sind ein weit verbreitetes in vitro Modell zur Messung der intestinalen Permeabilität von Wirkstoffen (Tarbit et al., 1998). Für β -KBA wurde eine moderate Permeabilität und für β -AKBA eine wesentlich geringere Permeabilität gemessen. Die Permeabilität für β -AKBA überstieg nicht den Wert von 0,05%. Daraus kann gefolgert werden, dass die schlechte Absorptionsrate von β -AKBA der Hauptgrund für die niedrige Bioverfügbarkeit ist (Krüger et al., 2009). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Erhöhung der Permeabilität von Boswelliasäuren durch die intestinalen epithelialen Schichten ein Schlüsselfaktor für die Behandlung mit Boswelliasäuren darstellt. Da es nach der Einnahme einer fettreichen Mahlzeit zu einem drei- bis fünffachen Anstieg der Konzentration von Boswelliasäuren im Plasma kommt (Stern et al., 2004), könnten lipidbasierte Trägerstoffe eine vielversprechende Möglichkeit sein, um die gastrointestinale Resorption von Boswelliasäuren zu erhöhen.

Die Konzentrationen von β -KBA und β -AKBA im Blutplasma und im Hirngewebe der Versuchstiere wurden in der vorliegenden Arbeit nicht bestimmt, so dass über die Resorptionsrate keine Aussage getroffen werden kann. Weiterhin wurde das applizierte H15[®] in NaCl gelöst.

6.4 Blut-Hirn-Schranke als Barriere

Ein weiterer bedeutender Aspekt der chemotherapeutischen Behandlung von Hirntumoren ist die Blut-Hirn-Schranke. Sie ist eine physiologische Barriere zwischen dem ZNS und dem Blutkreislauf und hat die Aufgabe, die Milieubedingungen im Gehirn aufrecht zu erhalten, sie von denen des Blutes abzugrenzen und folglich das Gehirn vor den im Blut zirkulierenden Toxinen zu schützen. Fettlösliche Substanzen und Nanopartikel können die Blut-Hirn-Schranke passieren. Ebenso können wasserlösliche Substanzen über spezielle Transportsysteme der Endothelzellen die Blut-Hirn-Schranke überwinden (Bradbury et al., 1979; Rapoport et al., 1976). Für eine erfolgreiche chemotherapeutische Behandlung von Hirntumoren, insbesondere von Tumorzellformationen mit infiltrierendem Wachstum, muss das Chemotherapeutikum die Blut-Hirn-Schranke passieren können. H15[®] zeigt eine hohe Lipidlöslichkeit (Safayhi et al., 1992). Durch seine Lipophilie ist H15[®] potenziell liquorgängig. Unter Verwendung einer neuen analytischen Methode (LC/MS) konnten in einem in vivo Versuch diese Liquorgängigkeit bewiesen werden. Drei Stunden nach einer einmaligen oralen Gabe von 240 mg/kg KG H15[®] konnten β -KBA und β -AKBA im Hirngewebe von Wistar-Ratten nachgewiesen werden. Dabei wurden Konzentrationen von 99 ng β -KBA/g Hirngewebe bzw. 95 ng β -AKBA/g Hirngewebe gemessen (Reising et al., 2005). Demzufolge ist davon auszugehen, dass Boswelliasäuren die Blut-Hirn-Schranke passieren und somit eine wesentliche Voraussetzung für die Behandlung von Hirntumoren erfüllen.

6.5 Wirkung der Boswelliasäuren auf die Leukotriensynthese

Das mit malignen Hirntumoren vergesellschaftete vasogene perifokale Hirnödem entsteht durch eine Störung der Blut-Hirn-Schranke. Die tumorassoziierte Angiogenese über VEGF führt zum Einsprossen von Kapillarendothelien, die eine anatomisch und funktionell unvollständige Blut-Hirn-Schranke aufweisen. Zusätzlich wird die Permeabilität der intakten Blut-Hirn-Schranke ortsständiger Kapillargefäße erhöht (Stewart et al., 1987). Mit zunehmender Malignität nimmt die Ausprägung dieser Merkmale zu (Proescholdt et al., 1999).

Das vasogene perifokale Ödem ist für einen wesentlichen Teil der Symptome von cerebralen Tumoren verantwortlich (Reulen et al., 1990). Zusätzlich zum Hirntumor hat es einen raumfordernden Effekt und trägt maßgeblich zu Erhöhung des intrakraniellen Drucks bei. Zudem führt es durch die Störung der Homöostase und durch Reduzierung des lokalen Blutflusses zu neurologischen Ausfällen (Uematsu et al., 2003). Maßgeblich verantwortlich für die Entstehung des peritumoralen Hirnödems ist die erhöhte Leukotriensynthese. Es konnte eine Korrelation zwischen der Leukotrienbildung (LTC_4) in malignen Gliomen und dem Ausmaß des peritumoralen Ödems gezeigt werden (Black et al., 1986; Simmet et al., 1990). Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass eine Korrelation zwischen der Biosynthesekapazität für Cysteinyl-Leukotriene im Tumorgewebe und dem Malignitätsgrad besteht. Es konnte auch gezeigt werden, dass das Enzym γ -Glutamyltranspeptidase (γ -GPT) in malignen Gliomen vermindert ist. γ -GPT inaktiviert Leukotriene und reduziert ihre Wirkung (Black et al., 1990; Baba et al., 1991). Die Folge der mangelnden Leukotrien-Inaktivierung ist eine lokale Steigerung der cerebralen Vasopermeabilität mit fokaler Ödementstehung.

In in vivo Studien konnte unter der Therapie mit H15[®] bei Patienten mit Glioblastoma multiforme ein dosisabhängiger Rückgang des perifokalen Ödems und eine Reduktion der Leukotriensynthese im Tumor gezeigt werden. In einer prospektiven, kontrollierten Studie an 29 Patienten mit einem malignen Gliom wurden 15 Patienten 3600 mg/d, 9 Patienten 2400 mg/d und 5 Patienten 1200 mg/d H15[®] verabreicht. Die Behandlung fand in den sieben Tagen vor der geplanten operativen Tumorextirpation statt. Die Tagesgesamtdosis wurde in drei gleichen Einzeldosen im 8-Stundenintervall verabreicht. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion des peritumoralen Ödems in der Behandlungsgruppe mit 3600 mg/d. Weiterhin zeigten diese Patienten eine Besserung ihrer neurologischen Symptome wie Kopfschmerzen, motorische Aphasie und Hemiparese (Böker und Winking, 1997). Diese beobachteten Wirkungen auf das peritumorale Ödem ergeben sich aus der Hemmung des Enzyms 5-Lipoxygenase durch die im H15[®] enthaltenen Acetyl- β -Boswelliasäuren, Acetyl-11-Keto- β -Boswelliasäuren und β -Boswelliasäuren (Ammon et al., 1991).

In einer weiteren Studie wurden 19 Kindern und Jugendlichen mit intrakraniellen Tumoren H15[®] in einer Dosierung bis 126 mg/kg KG pro Tag verabreicht.

Kernspintomographisch konnte bei einem Patienten mit peritumoralem Ödem ein antiödematöser Effekt belegt werden, ohne dass es bei der Behandlung zu den typischen Steroidnebenwirkungen kam. Fünf der 19 Kinder gaben eine Verbesserung des subjektiven Befindens an. Drei von 17 Patienten mit malignen Tumoren zeigten meist vorübergehend objektivierbare Veränderungen der neurologischen Symptome, wie z.B. die Rückbildung von Paresen. Diese Ergebnisse wurden als Folge eines antiödematösen Effekts von H15[®] interpretiert. Ein überlappender Effekt der zuvor erfolgten Chemotherapie bzw. Bestrahlung konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden. Eine antiproliferative Wirkung von H15[®] wurde nicht untersucht (Janssen et al., 2000).

Die Reduktion des perifokalen Ödems durch H15[®] könnte in der vorliegenden Studie ebenfalls eine Rolle spielen. Das peritumorale Ödem wurde im Rahmen der Studie nicht bestimmt, jedoch verbesserte sich die Vitalität der Versuchstiere dosisabhängig unter der Gabe von H15[®]. Es ist davon auszugehen, dass die festgestellte Verbesserung der Vitalität auf eine Verminderung des perifokalen Ödems zurückzuführen ist. Im Versuch zeigt der Vitalitätsindex nach einer 14-tägigen Behandlung mit H15[®] ein signifikant besseres Ergebnis in der Behandlungsgruppe A (240 mg/kg KG) im Vergleich zu den Gruppen B, C und D ($p < 0,05$). Die Gruppe B zeigt einen langsameren Abfall des Vitalitätsindex als die Behandlungsgruppen C und D. Jedoch nähert sich der Vitalitätsindex in der Gruppe B über den Behandlungszeitraum von 14 Tagen den Werten der Behandlungsgruppen C und D an. Zwischen der Gruppe C und D sind keine Unterschiede hinsichtlich des Vitalitätsindex zu beobachten. Aufgrund dieser Ergebnisse ist anzunehmen, dass für eine wirkungsvolle Verbesserung des Vitalitätsindex die Verabreichung einer Mindestdosis von H15[®] notwendig ist. Wird diese Mindestdosis unterschritten, zeigt sich kein signifikanter Therapieerfolg.

6.6 Vor- und Nachteile der Glukokortikoidtherapie

In histologischen Untersuchungen konnten im perifokalen Ödem mit erheblichem Abstand zum makroskopischen Primärtumor maligne Zellen nachgewiesen werden (Kelly et al., 1987; Halperin et al., 1989; Wallner et al., 1989). Diese Beobachtungen werden dadurch erklärt, dass das perifokale Ödem durch mechanische Erweiterung

des Extrazellarraums die Migration von Tumorzellen erleichtert (Ohnishi et al., 1990).

Angeichts der durch das perifokale Ödem verursachten Erleichterung der Migration von Tumorzellen kommt der Reduktion des Ödems eine entscheidende Rolle bei der Therapie von Hirntumoren zu. Zur kurzfristigen Therapie haben sich vor allem Glukokortikoide bewährt. Die bedeutendste pharmakologische Wirkung der Glukokortikoide ist ihr antiinflammatorischer Effekt. Durch eine Hemmung der Phospholipase-A₂ durch Glukokortikoide kann aus Membranphospholipiden keine Arachidonsäure bereitgestellt werden. Somit nimmt die Synthese aller Endprodukte aus der Freisetzung von Arachidonsäure, wie Prostaglandine oder Leukotriene, ab (Parente et al., 1984). Ebenfalls bedeutend für die antiinflammatorische Wirkung von Glukokortikoiden ist ihre Eigenschaft, Lysosomenmembranen zu stabilisieren und damit die Freisetzung von Entzündungsmediatoren zu verhindern. Dadurch kommt es zu einer verminderten Einwanderung von Granulozyten und mononukleären Phagozyten am Entzündungsort, zur Hemmung der Phagozytose und der Verminderung der Ödembildung durch Abdichtung des Gefäßendothels (de Waal, 1994). Diese abdichtende Wirkung auf die Zellmembran macht man sich bei der Behandlung des Hirnödems mit Glukokortikoiden zunutze.

Eng verbunden mit der antiinflammatorischen Wirkung ist der immunsuppressive Effekt der Glukokortikoide. Sie vermindern die Zahl der basophilen und eosinophilen Leukozyten sowie der Mono- und Lymphozyten, indem sie ihre Zellteilung verlangsamen. Die B- und T-Lymphozyten sowie die Interleukine I und II werden von Glukokortikoiden supprimiert. Auf diese Weise wird die Immunantwort unterdrückt und die Antikörperbildung reduziert. In hohen Dosen führen sie sogar zu einer Atrophie des lymphatischen Gewebes.

Glukokortikoide finden Anwendung in der Therapie von Leukämien. Hier induzieren sie in den entarteten Zellen des blutbildenden Systems Apoptose. Bei soliden Tumoren ist die Verwendung von Glukokortikoiden als Zusatztherapeutikum zu Zytostatika jedoch kritisch zu bewerten. Umfangreiche Daten aus präklinischen und klinischen Studien zeigen, dass Glukokortikoide im Verdacht stehen, Therapieresistenzen bei einer Vielzahl von malignen soliden Tumoren zu induzieren. Zudem scheint das Risiko einer Metastasierung unter dem Einsatz von Glukokortikoiden zuzunehmen (Mattern et al., 2007). Bei einer Untersuchung von

157 Tumorproben (gängige Tumorzelllinien, frisch isolierte Zellen aus Tumorgewebe, Tumortransplantate in Mäusen) stellte sich heraus, dass 89% der Tumoren unter Einfluss von Glukokortikoiden eine Resistenz gegen verschiedene Zytostatika, darunter Cisplatin und 5-Fluoruracil, sowie gegen mehrere Glukokortikoidderivate entwickelten. Dies wurde auf eine Hemmung der Apoptose, eine Steigerung der Lebensfähigkeit und des Zellzyklus der Tumorzellen sowie eine Schwächung des Immunsystems zurückgeführt (Zhang et al., 2007).

Die beschriebene Immunsuppression, die Ausbildung von Resistenzen gegenüber Zytostatika, die Förderung einer Metastasierung und die erheblichen Nebenwirkungen bei einer Langzeittherapie (Chushing-Syndrom) stellen ernstzunehmende Nachteile der Glukokortikoidbehandlung dar. Deshalb sind neue Wirkstoffe mit geringeren Nebenwirkungen für die Langzeittherapie wünschenswert. H15[®] könnte als Langzeittherapeutikum eine Alternative zu Kortikosteroiden darstellen. Durch den Ersatz oder die Reduktion der Kortikosteroide könnten die Nebenwirkungen reduziert werden.

6.7 Wirkung der Boswelliasäuren auf Topoisomerasen

Neben den Auswirkungen auf das peritumorale Hirnödem kann die antiproliferative Wirkung von H15[®] für die Therapie von malignen Gliomen von zentraler Bedeutung sein. In Experimenten an C6-Gliomzellkulturen, die mit H15[®] behandelt wurden, konnte eine konzentrationsabhängige Hemmung der C6-Zellproliferation gezeigt werden (Held et al., 1996). In HL60 Zellen konnte neben einer Hemmung der Zellproliferation eine Induktion von Apoptose und eine Hemmung der Topoisomerase I durch die in H15[®] enthaltenen Boswelliasäuren beobachtet werden (Hoernlein et al., 1997). Aufgrund ihrer essentiellen Funktion sind Topoisomerasen geeignete Zielstrukturen für Zytostatika. Es konnte ein Zusammenhang zwischen der Aktivität von Topoisomerase Typ I oder II und Malignisierung von Gewebe beobachtet werden. So zeigen Studien an Kolonkarzinomgewebe eine Erhöhung der Topoisomerase I Aktivität. Hier besteht eine Korrelation zwischen dem Malignitätsgrad und der Erhöhung der Topoisomerase I Aktivität (Giovanella et al., 1989). In anderen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass es in entarteten Zellen zu einer weitgehenden Aufhebung der zellzyklusabhängigen Aktivität von

Topoisomerase II kommt (Sullivan et al., 1987). Die pharmakologische Blockierung dieser Enzyme gewann daher hinsichtlich der Entwicklung neuer Antitumormedikamente an Bedeutung (Burden und Osheroﬀ, 1998).

Die in H15[®] enthaltenen Boswelliasäuren werden zu der Gruppe der katalytischen Inhibitoren der Topoisomerasen gezählt, da sie ein frühes Eingreifen in den Reaktionszyklus der Topoisomerasen mit Verhinderung von Strangbrüchen aufweisen. Sie beeinträchtigen die Funktion der Topoisomerasen, indem sie direkt an die hoch affinen Bindungsstellen von Topoisomerase I und IIa binden und folglich mit der DNA um die Bindung konkurrieren (Hoernlein et al., 1999; Syrovets et al., 2000; Held et al., 1996). H15[®] ist gekennzeichnet durch ein mildes Nebenwirkungsspektrum. Das mutagene Potenzial ist im Vergleich zu Topoisomerasegiften gering (Benchokraun et al., 1995). Deshalb ist es naheliegend, H15[®] für die Therapie maligner Gliome in Erwägung zu ziehen.

Die Tierversuche der vorliegenden Studie zeigen, dass eine Behandlung mit H15[®] zu einer Hemmung des Gliomwachstums führt. Aus den Ergebnissen kann gefolgert werden, dass H15[®] eine antiproliferative Wirkung hat und dass diese Wirkung dosisabhängig ist. Für einen signifikanten Behandlungserfolg muss eine Minstdosis verabreicht werden. Diese Minstdosis war im Versuch bei der Behandlungsgruppe C noch nicht erreicht. Erst die Verdopplung der Dosis bewirkte in der Behandlungsgruppe B eine signifikante Verminderung des Tumorwachstums. Folglich liegt die Minstdosis zur Erreichung einer signifikanten Verminderung des Tumorwachstums zwischen 60 mg/kg KG und 120 mg/kg KG.

Aufgrund dieser im Tierversuch ermittelten Daten läge bei einem angenommenen Körpergewicht von 70 kg die für eine signifikante Verminderung des Tumorwachstums notwendige tägliche H15[®]-Dosis bei rund 8400 mg. Diese hohe Dosis könnte Unverträglichkeiten zur Folge haben. Deshalb müssten Wege gefunden werden, bei geringeren Dosen eine bessere Bioverfügbarkeit zu erreichen. Allerdings ist die berechnete Dosis von 8400 mg grundsätzlich in Frage zu stellen. Denn eine derart unmittelbare Übertragung der im Tierversuch gewonnenen Ergebnisse auf den Menschen ist nicht zulässig. Vielmehr sind zur genaueren Eingrenzung der Minstdosis weitere Untersuchungen nötig. Erste Hinweise auf mögliche Dosierungen für die Anwendung am Menschen geben die oben erwähnten Untersuchungen wieder (Janssen et al., 2000; Böker und Winking, 1997).

Die beobachtete Verminderung des Tumorwachstums ist auf die Induktion von Apoptose durch die in H15[®] enthaltenen Acetyl-Boswelliasäuren zurückzuführen. Die Zahl der apoptotischen Zellen war in der Behandlungsgruppe A mit 240 mg/kg KG signifikant höher als in der Kontrollgruppe D ($p < 0,05$). Während in der Kontrollgruppe durchschnittlich 13,2 apoptotische Zellen gezählt wurden, waren es in Gruppe A durchschnittlich 32,7. Durch die hohe Dosierung von H15[®] in Gruppe A stieg die Zahl der apoptotischen Zellen gegenüber der Kontrollgruppe D um 147,7 %. In Gruppe B kam es zu einem Anstieg um 106,8 % auf 27,3 apoptotische Zellen, in Gruppe C wurde ein Anstieg um 50,8 % auf durchschnittlich 19,9 apoptotische Zellen beobachtet. Der Vergleich der Ergebnisse der vier Behandlungsgruppen lässt auf einen dosisabhängigen Einfluss von H15[®] auf den programmierten Zelltod schließen.

6.8 Klinische Relevanz und Aussichten

Die vorliegende tierexperimentelle Studie belegt eine dosisabhängige, antiproliferative und Apoptose induzierende Wirkung von H15[®]. Es ist davon auszugehen, dass diese Wirkungen auf die im H15[®] enthaltenen Boswelliasäuren zurückzuführen sind. Angesichts der ermutigenden Ergebnisse dieses Tierversuchs sollten weitere Untersuchungen der möglichen Eignung von H15[®] bzw. von Boswelliasäuren für die klinische Anwendung durchgeführt werden. Ein mögliches Hindernis für die klinische Anwendung von H15[®] liegt im phytopharmakologischen Ursprung der Substanz. Das Phytopharmakon H15[®] ist ein Extrakt, das verschiedene Subtypen von Boswelliasäuren beinhaltet. Die Konzentration der pharmakologisch wirksamen Bestandteile in dem oral verabreichten Gemisch ist abhängig vom Reinheitsgrad, der bei der Extraktion aus dem Weihrauchharz erzielt wird. Es sind deshalb Schwankungen in der Qualität verschiedener Chargen denkbar. Sie könnten zur Beeinflussung der enteralen Resorption und des Behandlungserfolges führen. Weiterhin können sich Wirkungen der Inhaltsstoffe des Weihrauchextraktes H15[®] teilweise wieder aufheben. Diese Qualitätsschwankungen können durch Extraktion und Reinigung der wichtigsten Subtypen der Boswelliasäuren gelöst werden. Mit diesen gereinigten Substanzen wäre die Identifikation der Boswelliasäuren und eine standardisierte klinische Behandlung möglich. Nach erfolgreicher Behandlung von

Gliomzellen in Zellkulturen werden pharmakokinetische Experimente und Messungen der Gewebekonzentrationen von Boswelliasäuren in vivo nötig sein. Bevor jedoch die Substanz als Wirkstoff bei Hirntumoren empfohlen werden kann, müssen noch einige Aspekte geklärt werden. Insbesondere müssen in einer Pilotstudie an Patienten mit Glioblastomen ähnliche Ergebnisse aufgezeigt werden. Solche Pilotstudien würden die Voraussetzung für eine umfassende kontrollierte klinische Prüfung des Präparates schaffen. Weiterhin müssen weitere Erkenntnisse über die Pharmakokinetik vorliegen. Möglicherweise eröffnet H15[®] bzw. die extrahierten Boswelliasäuren neue Chancen für die Behandlung von malignen Gliomen.

7 Zusammenfassung

Die konventionelle Therapie von malignen Gliomen (operative Entfernung, Bestrahlung, Chemotherapie) erzielt keine nachhaltigen Erfolge. Die Prognose von Patienten mit malignen Gliomen richtet sich nach wie vor nach der histologischen Wertigkeit des Tumors und dem Karnowski-Index des Patienten. Um die Ergebnisse der Therapie von malignen Gliomen zu verbessern, werden zusätzliche therapeutische Möglichkeiten benötigt. In früheren klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass sich unter der Therapie mit H15[®] die perifokalen Ödeme bei Patienten mit malignen Gliomen signifikant zurückbilden und sich zudem ihre klinischen Symptome verbessern. Es war darüber hinaus eine Abnahme der Ausscheidung von LTE₄, einem Metaboliten der Leukotriensynthese in Hirntumoren, zu beobachten. Zudem wurde in Zellkulturen eine proliferationshemmende Aktivität von H15[®] festgestellt.

Mit der vorliegenden tierexperimentellen Studie wurden Einflüsse von H15[®] auf das Tumorstadium untersucht. 40 weiblichen Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 220g bis 250g wurden C6-Gliomzellen in den rechten Nucleus caudatus injiziert. Die Tiere wurden randomisiert und in vier Gruppen zu jeweils 10 Tieren unterteilt. Drei dieser Gruppen wurden mit verschiedenen Dosen von H15[®] behandelt; die vierte Gruppe diente als Kontrollgruppe. Nach 14 tägiger Verabreichung von H15[®] (3mal täglich) vom Tag nach der Tumorzellimplantation an wurden die Gehirne entnommen und mikroskopisch untersucht. Es wurde eine signifikante Stabilisierung des Vitalitätsindex in der Behandlungsgruppe mit der höchsten Medikamentendosis im Vergleich zur Kontrollgruppe aufgezeigt. Abhängig von der Dosierung wurde weiterhin ein signifikanter Unterschied im Tumorstadium festgestellt. Der Anteil induzierter, apoptotischer Zellen war in Tieren, die mit hohen Dosen behandelt wurden, signifikant größer, als bei Tieren mit niedriger Dosierung. Bei den Tieren wurden keine bzw. geringe Nebenwirkungen auf das verabreichte Medikament beobachtet. Diese Daten belegen einen hemmenden Einfluss von H15[®] auf das Wachstum von C6-Gliomzellen in Rattenhirnen.

8 Summary

The conventional malignant glioma therapy (surgery, radiation therapy and chemotherapy) does not yield satisfying results. The prognosis of the glioma patient depends more on the histological grading of the tumor and the patient's age than on the therapy. Especially the adjuvant chemotherapy does not influence survival time in glioma patients significantly. To improve results in malignant glioma therapy additional therapeutic regimes are necessary. An earlier study showed a significant reduction of perifocal edema in patients with malignant glioma under therapy with H15[®], accompanied with a clinical improvement. Also a decrease of urinary LTE₄-excretion as a metabolite of leukotriene synthesis in brain tumors was observed. Furthermore a proliferation inhibiting activity of H15[®] was found in cell cultures.

The purpose of this experimental study was to examine the effects of the boswellic acids, which are constituents of an extract from gum resin, on tumor growth in vivo. Fourty female wistar rats weighing 220–250 g were inoculated C6 tumor cells into the right caudate nucleus and randomization into 4 groups each with 10 rats. The treatment groups received different dosages and were compared to a control group without any additional treatment. Drug treatment (3 times per day) was started immediately after implantation and stopped after 14 days. The animals were sacrificed and the brains were examined microscopically. Comparing low and high dosage of H15[®] treatment a significant difference in tumor volume was detected. The vitality index in animals with high dose treatment was significantly better than in the low dose treatment group. The proportion of apoptotic tumor cells in animals with high dose treatment was significantly larger than in the low dose treatment group. Only milde side effects were observed by the animal during the therapy with H15[®]. These data demonstrate an antiproliferative influence of H15[®] in rat glioma growth.

9 Literaturverzeichnis

Abbott NJ 2000. Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability. *Cell Mol Neurobiol* Apr 20(2):131-47.

Abbott NJ, Revest PA 1991. Control of brain endothelial permeability *Cerebrovasc. Brain Metab Rev* 3:39-72.

Abramovitch R, Meir G, Neeman M 1995. Neovascularization induced growth of implanted C6 glioma multicellular spheroids: magnetic resonance microimaging. *Cancer Res* May 1;55(9):1956-62.

Abrey LE, Childs BH, Paleologos N, Kaminer L, Rosenfeld S, Salzman D, Finlay JL, Gardner S, Peterson K, Hu W, Swinnen L, Bayer R, Forsyth P, Stewart D, Smith AM, Macdonald DR, Weaver S, Ramsey DA, Nimer SD, DeAngelis LM, Cairncross JG 2003. High-dose chemotherapy with stem cell rescue as initial therapy for anaplastic oligodendroglioma. *J Neurooncol* Nov; 65(2):127-34.

Agarwal SK, Rastogi RP 1974. Triterpenoid saponins and their genins. *Phytochemistry* 13:2623-2645.

Albert K, Forsting M, Sartor et al. 1994. Early postoperative magnetic resonance imaging after resection of malignant glioma: Objective evaluation of residual tumor and its influence on regrowth and prognosis. *Neurosurgery* 34: 45-61.

Alderson LM, Castleberg RL, Harsh GR, Louis DN, Henson JW 1995. Human gliomas with wild-type p53 express bcl-2. *Cancer Res* 55:999-1001.

Ammon HPT 1992. Weihrauch – ein neuer Weg in der Therapie von Entzündungen. *Deutsche Apotheker Zeitung* 45:2442-2444.

Ammon HPT 1996. Salai Guggal – *Boswellia serrata*: from a herbal medicine to a specific inhibitor of leukotriene biosynthesis. *Phytomedicine* 3:67–70.

Ammon HPT, Mack T, Singh GB, Safayhi H 1991. Inhibition of leukotriene B₄ formation in rat peritoneal neutrophils by an ethanolic extract of the gum resin exudate of *Boswellia serrata*. *Planta Med* 57:203-207.

Ammon HPT, Safayhi H, Mack T, Sabieraj J 1993. Mechanism of anti-inflammatory actions of curcumine and boswellic acids. *Journal of Ethnopharmacie* 38:113-119.

Baba T, Black KL, Ikezaki K, Chen KN, Becker DP 1991. Intracarotid infusion of leukotriene C₄ selectively increases blood-brain barrier permeability after focal ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 11:638-43.

Baguley BC, Ferguson LR 1996. Mutagenic properties of topoisomerase-targeted drugs. *Biochimica et Biophysica Acta* 1400:213-222.

Barak Y, Juven T, Haffner R, Oren M 1993. mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *Embo J* 12(2):461-8.

Barker FG 2nd, Chang SM, Valk PE, Pounds TR, Prados MD 1997. 18-Fluorodeoxyglucose uptake and survival of patients with suspected recurrent malignant gliomas. *Cancer* 79:115-126.

Basu N, Rastogi RP 1967. Triterpenoid saponins and sapogenins. *Phytochemistry* 6:1249-1270.

Belsner K, Büchele B, Werz U, Syrovets T, Simmet T 2003. Structural analysis of pentacyclic triterpenes from the gum resin of *Boswellia serrata* by NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry* 41:115-122.

Benchokroun Y, Couprie J, Larsen AK 1995. Aurintricarboxylic acid, a putative

inhibitor of apoptosis, is a potent inhibitor of DNA topoisomerase II in vitro and in Chinese hamster fibrosarcoma cells. *Biochemical Pharmacology* 49:305-313.

Benda P, Lightbody J, Sato G, Levine L, Sweet W 1968. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* 161:370-371.

Bernstein JJ, Laws ER Jr, Levine KV, Wood LR, Tadvalkar G, Goldberg WJ 1991. C6 glioma-astrocytoma cell and fetal astrocyte migration into artificial basement membrane: a permissive substrate for neural tumors but not fetal astrocytes. *Neurosurgery* May;28(5):652-8.

Biernat W, Tohma Y, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H 1997. Alterations of cell cycle regulatory genes in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol* 94:303-309.

Bigner SH and Vogelstein B 1990. Cytogenetics and molecular genetics of malignant gliomas and medulloblastomas. *Brain Pathol* 1:12-18.

Black KL, Hoff JT, Mc Gillicuddy JE, Gebarski SS 1986. Increased leukotriene C4 and vasogenic edema surrounding brain tumors in humans. *Ann Neurol* 19:592-5.

Black KL, King WA, Ikezaki K 1990. Selective opening of the blood-tumor barrier by intracarotid infusion of leukotriene C4. *J Neurosurg* 72:912-6.

Bögler O, Huang HJS, Kleihues P, Cavenee WK 1995. The p53 gene and its role in human brain tumors. *Glia* 15:308-327.

Böcker DK, Winking M 1997. Die Rolle von Boswellia-Säuren in der Therapie maligner Gliome. *Deutsches Ärzteblatt* 94, Heft 18.

Borgeat P, Samuelsson B 1979. Arachidonic acid metabolism in polymorphonuclear leukocytes: unstable intermediate in formation of dihydroxy

acids. Proceedings of the National Academy of Sciences 76:3213-3217 (USA).

Boström J, Cobbers JM, Wolter M, Tabatabai G, Weber RG, Lichter P, Collins VP, Reifenberger G 1998. Mutation of the PTEN (MMAC1) tumor suppressor gene in a subset of glioblastomas but not in meningiomas with loss of chromosome arm 10q. Cancer Res Jan 1;58(1):29-33.

Brada M, Hoang-Xuan K, Rampling R, Dietrich PY, Dirix LY, Macdonald D, Heimans JJ, Zonnenberg BA, Bravo-Marques JM, Henriksson R, Stupp R, Yue N, Bruner J, Dugan M, Rao S, Zaknoen S 2001. Multicenter phase II trial of temozolomide in patients with glioblastoma multiforme at first relapse. Ann Oncol 12(2):259-66.

Bradbury M 1979. The Concept of a Blood–Brain Barrier. J Wiley, New York.

Bragg DG, Osborn AG 1991. CNS imaging of neoplasms. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1 Aug;21(3):841-5.

Brandes AA, Fiorentino MV 1996. The role of chemotherapy in recurrent malignant gliomas: an overview. Cancer Investigation 14:551-559.

Breyer R, Hussein S, Radu DL, Putz KM, Gunia S, Hecker H, Samii M, Walter GF, Stan AC 2000. Disruption of intracerebral progression of C6 rat glioblastoma by in vivo treatment with anti-CD44 monoclonal antibody. J Neurosurg 92:140 – 149.

Brieskorn CH 1987. Triterpenoide - physiologische Funktionen und therapeutische Eigenschaften. Pharmazie in unserer Zeit 16:161-179.

Brock TG, Nagaprakash K, Margolis DI, Smolen JE 1994 Modeling degranulation with liposomes: effect of lipid composition on membrane fusion. J Membr Biol Aug;141(2):139-48.

Buckner J, Fulton D, Dropcho E, Stewart D, Schold C 1994. Chemotherapy for anaplastic oligodendroglioma. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group, J Clin Oncol 12:2013-21.

Bullock R 1995. Mannitol and other diuretics in severe neurotrauma. New Horiz Aug 3(3):448-52.

Bulmer JN, Thrower S, Wells M 1989. Expression of epidermal growth factor receptor and transferrin receptor by human trophoblast population. Am J Reprod Immunol, Nov-Dec;21(3-4):87-93.

Burden DA, Osterhoff N 1998. Mechanism of action of eucaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme. Biochim Biophys Acta Oct 1;1400(1-3):139-54.

Byrne TN 1994. Imaging of gliomas. Semin Oncol Apr;21(2):162-71.

Cadwell C, Zambetti GP 2001. The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth. Gene 277(1-2):15-30.

Cairncross JG, Pexman JH, Rathbone MP et al. 1985. Postoperative contrast enhancement in patients with brain tumors. Ann Neurol 6:570-572.

Capranico G, Binaschi M, Borgnetto ME, Zunino F, Palumbo M 1997. A protein mediated mechanism for the DNA sequence specific action of topoisomerase II poisons. Trends in Pharmacological Sciences 18:323-329.

Chang P, Schwartz RW 2001. Crohn's disease: Current Concepts in diagnosis and treatment. Curr Surgery 58:288-292.

Choucair AK, Levin VA, Gutin PH, Davis RL, Silver P, Edwards MS, Wilson CB 1986. Development of multiple lesions during radiation therapy and chemotherapy in patients with gliomas. J Neurosurg Nov 65(5):654-8.

Coffey, R J; Lunsford, L D; Taylor, F H 1988. Survival after stereotactic biopsy of malignant gliomas. *Neurosurgery* March 22(3):465-73.

Collins VP 1995. Gene amplification in human gliomas. *Glia* 15:289-296.

Collins VP, James CD 1993. Gene and chromosomal alterations associated with the development of human gliomas. *Faseb J* 7:926-930.

Connolly DT 1991. Vascular permeability factor: a unique regulator of blood vessel function. *J Cell Biochem* Nov;47(3):219-23.

Criscuolo FR, Lelkes PI, Rotrosen D, Oldfield EH 1989. Cytosolic calcium changes in endothelial cells induced by a protein product of human gliomas containing vascular permeability factor activity. *J Neurosurg* 71:884-891.

Criscuolo GR 1993. The genesis of peritumoral vasogenic brain edema and tumor cysts: a hypothetical role for tumor-derived vascular permeability factor. *Yale J Biol Med* Jul-Aug;66(4):277-314.

Culioli G, Mathe C, Archier P, Vieillescazes C 2003. A lupane triterpene from frankincense (*Boswellia* sp., Burseraceae). *Phytochem* 62:537-541.

Dahlén SE 1983. Pulmonary effects of leukotrienes. *Acta Physiologica Scandinavica* 512:1-51.

Dahlén SE, Björck T, Hedqvist P 1987. Bioassay of leukotrienes. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 17B:615-21.

Daumas-Duport C, Scheithauer B, O'Fallon J, Kelly P 1988. Grading of Astrocytomas, A Simple and Reproducible Method. *Cancer* 62:2152-2165.

Davis FG, Mc Carthy BJ, Freels S, Kupelian V, Bondy ML 1999. The conditional probability of survival of patients with primary malignant brain tumors.

Surveillance, epidemiology, and end results (SEER) data. Cancer 85:485-491.

Deimling A, Bender B, Jahnke R 1994. Loci associated with malignant progression in astrocytomas: a candidate on chromosome 19q. Cancer Res 54:1397-1401.

Deimling A, Louis DN, von Ammon K, Petersen I, Hoell T, Chung RY, Martuza, RL, Schoenfeld DA, Yasargil MG, Wiestler OD 1992. Association of epidermal growth factor receptor gene amplification with loss of chromosome 10 in human glioblastoma multiforme. J Neurosurg 77(22):295-301.

Dennis EA 1997. The growing Phospholipase A2 superfamily of signal transduction enzymes. Trends in Biochemical Sciences 22(1):1-2.

Desai D, Wessling HC, Fisher RP, Morgan DO 1995. Effects of phosphorylation by CAK on cyclin binding by CDC2 and CDK2. Mol Cell Biol 15(1):345-50.

Devaux BC, O'Fallon JR, Kelly PJ 1993. Resection, biopsy, and survival in malignant glial neoplasms. A retrospective study of clinical parameters, therapy, and outcome. J Neurosurg May 78(5):767-75.

de Waal RM 1944. The anti-inflammatory activity of glucocorticoids. Mol Biol Rep Mar 19(2):81-8. Review.

Dinapoli RP, Brown LD, Arusell RM, Earle JD, O'Fallon JR, Buckner JC, Scheithauer BW, Krook JE, Tschetter LK, Maier JA, et al. 1993. Phase III comparative evaluation of PCNU and carmustine combined with radiation therapy for high-grade glioma. J Clin Oncol Jul 11(7):1316-21.

Dowling C, Bollen AW, Noworolski SM, et al. 2001. Preoperative proton MR spectroscopic imaging of brain tumors: correlation with histopathologic analysis of resection specimens. AJNR 22:604-612.

Eisenberg HM, Barlow CF, Lorenzo AB 1970. Effect of dexamethasone on altered brain vascular permeability. *Arch Neurol* 23:18-22.

Ekstrand AJ, James CD, Caveness WK, Seliger B, Pettersson RF, Collins VP 1991. Genes for epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, and epidermal growth factor and their expression in human gliomas in vivo. *Cancer Res* 51(8):2164-2172.

Ekstrand AJ, Longo N, Hamid ML, Olson JJ, Liu L, Collins VP, James CD 1994. Functional characterisation of an EGF receptor with a truncated extracellular domain expressed in glioblastomas with EGFR gene amplification. *Oncogene* 9:2313-2320.

Ennet D, Poetsch F, Schopka D 2000. Indischer Weihrauch. Pharmazeutische Bewertung der Harzdroge und ihrer Zubereitungen. *Deutsche Apotheker Zeitung* 140:105-113.

Fakharzadeh SS, Trusko SP, George DL 1991. Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line. *Embo J* 10(6):1565-9.

Farrell CL, Stewart PA, Del Maestro RF 1987. A new glioma model in rat: the C6 spheroid implantation technique permeability and vascular characterization. *J Neurooncol* 4:403-415.

Ferguson LR, Baguley BC 1996. Mutagenicity of anticancer drugs that inhibit topoisomerase enzymes. *Mutation Research* 355:91-101.

Finlay CA 1993. The mdm-2 oncogene can overcome wild-type p53 suppression of transformed cell growth. *Mol Cell Biol* 13(1):301-6.

Forsting M, Albert FK, Kunze S, et al. 1993. Exstirpation of Glioblastomas: MR and CT follow-up of residual tumor and growth patterns.

AJNR Am J Neuroradiol 14:77-87.

Forsyth PAJ, Petrov E, Mahallati H, et al. 1997. Prospective study of postoperative magnetic resonance imaging in patients with malignant gliomas. J Clin Oncol 15:2076-2081.

Froelich-Ammon SJ, Osheroff N 1995. Topoisomerase poisons: harnessing the dark side of enzyme mechanism. J Biol Chem 270:21429-21432.

Fults D, Petronio J, Bradley DN, Pedone CA 1992. Chromosome 11p15 deletions in human malignant astrocytomas and primitive neuroectodermal tumors. Genomics 14:799-801.

Gaetani P, Butti G, Chiabrando C, Danova M, Castelli MG, Riccardi A, Assietti R, Paoletti P 1991. A study on the biological behavior of human brain tumors. Part I. Arachidonic acid metabolism and DNA content. J Neurooncol Jun;10(3):233-40.

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Bio 119(3):493-501.

Gerhardt H 2001. Therapeutischer Nutzen des Boswellia-serrata-Extrakts H15. Med Welt 52:37-39.

Gerhardt H, Seifert F, Buvari P, Vogelsang H, Repges R 2000. Therapie des aktiven Morbus Crohn mit dem Boswellia-serrata-Extrakt H15. Z Gastroenterol 39:11-17.

Giaccia AJ, Kastan MB 1998. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. Genes Dev 12(19):2973-83.

Giovanella BC, Stehlin JS, Wall ME, Wani MC, Nicholas AW, Liu LF, Silber R, Potmesil M 1989. DNA topoisomerase I-targeted chemotherapy of human colon

cancer in xenografts. *Science* 246:1046-1048.

Glaser T, Winter S, Groscurth P, Safayhi H, Sailer ER, Ammon HTP, Schabet M, Weller M 1999. Boswellic acids and malignant glioma: induction of apoptosis but no modulation of drug sensitivity. *British Journal of Cancer* 80:756-765.

Goldbrunner R, Bendszus M, Tonn JC 2004. Models for Angiogenesis in Gliomas. *Cancer Treat Res* 117:115-35.

Goldman S, Levivier M, Pirotte B, et al. 1996. Regional glucose metabolism and histopathology of gliomas. A study based on positron emission tomography-guided stereotactic biopsy. *Cancer* 78:1098-1106.

Goracci G, Horrocks LA, Porcellati G 1978. Studies of rat brain choline ethanolamine phosphotransferases using labeled alkylacylglycerol as substrate with evidence for eversibility of the reactions. *Adv Exp Med Biol* 101:269-78.

Grobber B, De Deyn PP, Slegers H 2002. Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. *Cell Tissue Res* 310:257-270.

Gupta I, Parihar A, Malhotra P, Singh GB, Ludtke R, Safayhi H, Ammon HP 1997. Effects of *Boswellia serrata* gum resin in patients with ulcerative colitis, *Eur J Med Res* 2:37-43.

Hairfield EM, Hairfield HH, Pentz LH 1984. A Rapid Test for the Identification of Incense Resins. *Perfumer Flavorist* 9:33-36.

Hall SR, Campbell LE, Meek DW 1996. Phosphorylation of p53 at the casein kinase II site selectively regulates p53-dependent transcriptional repression but not transactivation. *Nucleic Acids Res* 24(6):1119-26.

Halperin EC, Wehn SM, Scott JW, Djang W, Oakes WJ, Friedman HS 1989.

Selection of a management strategy for pediatric brainstem tumors. *Med Pediatr Oncol* 17(2):117-26.

Harris SL, Levine AJ 2005. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* 24(17):2899-908.

Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason WP, Mariani L, Bromberg JEC, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross G, Janzer R, Stupp R 2005. MGMT gene silencing and response to temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 352:997-1003.

Heiss P, Mayer S, Herz M, Wester HJ, Schwaiger M, Senekowitsch-Schmidtke R 1999. Investigation of transport mechanism and uptake kinetics of O-(2-[18F]fluoroethyl)-L-tyrosine in vitro and in vivo. *J Nucl Med* 40:1367-1373.

Held RM, Winking M, Simmet T 1996. Cysteinyl leukotrienes as potential mediators of the peritumoral brain oedema in astrocytoma patients. *Naunyn Schmiedeberg's Archive of Pharmacology* 353:Abstr. 538.

Hermanson M, Funa K, Koopmann J 1996. Association of loss of heterozygosity on chromosome 17p with high platelet-derived growth factor alpha receptor expression in human malignant gliomas. *Cancer Res* 56:164-171.

Hill JS, Kahl SB, Stylli SS, Nakamura Y, Koo MS, Kaye AH 1995. Selective tumorkill of cerebral glioma by photodynamic therapy using a boronated porphyrin photosensitizer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92:12126-12130 (USA).

Hirashima Y, Hayashi N, Fukuda O, Ito H, Endo S, Takaku A 1998. Platelet-activating factor and edema surrounding meningiomas. *J Neurosurg* Feb;88(2):304-7.

Hoernlein RF, Orlikowsky F, Zehrer C 1997. Acedtyl-11-ketoboswellic acid

induces apoptosis in HL 60 and CCRF-CEM cells and inhibits topoisomerase I. *ProcAmAssoc Canc Res* 38:1291.

Hoernlein RF, Orlikowsky T, Zehrer C, Niethammer D, Sailer ER, Simmet T, Dannecker GE, Ammon HPT 1999. Acetyl-11-keto- β -boswellic acid induces apoptosis in HL-60 and CCRF-CEM cells and inhibits topoisomerase I. *J Pharmacol Exp Ther* 288:613-619.

Ichimura K, Schmidt EE, Goike HM, Collins VP 1996. Human glioblastomas with no alterations of the CDKN2A (p16INK4a, MTS1) and CDK4 genes have frequent mutations of the retinoblastoma gene. *Oncogene* 13:1065-1072.

Ichimura K, Schmidt EE, Miyakawa A, Goike HM, Collins VP 1998. Distinct patterns of deletion on 10p and 10q suggest involvement of multiple tumor suppressor genes in the development of astrocytic gliomas of different malignancy grades, *Genes Chromosomes. Cancer* 22(1):9-15.

Imaizumi S, Kondo T, Deli MA, Gobbel G, Epstein CJ, Yoshimoto T, Chan PH 1996. The influence of oxygen free radicals on the permeability of the monolayer of cultured brain endothelial cells. *Neurochem Int* 29:205-11.

Jaekle KA 1991. Neuroimaging for central nervous system tumors. *Semin Oncol* Apr;18(2):150-7.

James CD, Carlbom E, Dumanski JP, Hansen M, Nordenskjöld M, Collins VP, Cavenee WK 1988. Clonal genomic alterations in glioma malignancy stages. *Cancer Res* 48:5546-5551.

Janssen G, Bode U, Breu H, Dohrn B, Engelbrecht V, Göbel U 2000. Boswellic acids in the palliative therapy of children with progressive or relapsed brain tumors. *Klinische Pädiatrie* 212:189-195.

Jolesz FA, Jones KM 1993. Fast spin-echo imaging of the brain. *Top Magn Reson*

Imaging Winter;5(1):1-13.

Jolliet-Riant P, Tillement J 1999. Drug transfer across the blood-brain barrier and improvement of brain delivery. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 13:16-26.

Kaba SE, Langford LA, Yung WK, Kyritsis AP 1996. Resolution of recurrent malignant ganglioglioma after treatment with cis-retinoic acid. *J Neurooncol* Oct;30(1):55-60.

Karlbom AE, James CD, Boethius J, Cavenee WK, Collins VP, Nordenskjöld M, Larsson C 1993. Loss of heterozygosity in malignant gliomas involves at least three distinct regions on chromosome 10. *HumGenet* 92(2):169-174.

Kaschten B, Stevenaert A, Sadzot B, Deprez M, Degueldre C, Del Fiore G, et al. 1998. Preoperative evaluation of 54 gliomas by PET with fluorine-18-fluorodeoxyglucose and/or carbon-11-methionine. *J Nucl Med* 39:778–785.

Katayama Y, Tsubokawa T, Miyazaki S, Kawamata T, Yoshino A 1990. Oedema fluid formation within contused brain tissue as a cause of medically uncontrollable elevation of intracranial pressure: the role of surgical therapy. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 51:308-10.

Kayama T, Tominaga T, Yoshimoto T 1996. Management of pilocytic astrocytoma. *Neurosurg Rev* 19:217-220.

Kelly PJ, Daumas-Duport C, Kispert DB, Kall BA, Scheithauer BW, Illig JJ 1987. Imaging-based stereotaxic serial biopsies in untreated intracranial glial neoplasms. *J Neurosurg* Jun;66(6):865-74.

Kennedy JC, Pottier RH 1992. Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* Jul 30;14(4):275-92.

Kim DH, Mohapatra G, Bollen A, Waldman FM, Feuerstein BG 1995a.

Chromosomal abnormalities in glioblastoma multiforme tumors and glioma cell lines detected by comparative genomic hybridization. *Int J Cancer* 60:812-819.

Kiwak KJ, Moskowitz MA, Levine L 1985. Leukotriene production in gerbil brain after ischemic insult, subarachnoid hemorrhage, and concussive injury. *Journal of Neurosurgery* 62:865-869.

Kleihues P, Burger PC, Collins VP, Newcomb EW, Ohgaki H, Cavanee WK 2000. Glioblastoma. In: Kleihues P and Cavanee WK. *Pathology and Genetics of Tumors of the Nervous System. WHO Classification of Tumors*. Lyon, France: IARC Press 29-39.

Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW 1993. *Histological typing of tumours of the central nervous system* (2nd edn). Springer-Verlag Berlin.

Kleihues P, Cavanee WK 2000. *Pathology and genetics of tumors of the nervous system*. IARC Press, Lyon.

Kleihues P, Lübke J, Watanabe K, von Ammon K, Ohgaki H 1994. Genetic alterations associated with glioma progression. *Verh Dtsch Ges Path* 78:43-7.

Kleihues P, Ohgaki H 1999. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neurooncol* 1:44-51.

Kleihues P, Soylemezoglu F, Schäuble B, Scheithauer BW, Burger P 1995. Histopathology Classification and grading of gliomas. *Glia*, 15:211-21.

Kondo S, Morimura T, Barnett GH, Kondo Y, Peterson JW, Kaakaji R, Takeuchi J, Toms SA, Liu J, Werbel B, Barna BP 1996. The transforming activities of MDM2 in cultured neonatal rat astrocytes. *Oncogene* 13(8):1773-9.

Korsmeyer SJ, Gross A, Harada H, Zha J, Wang K, Yin XM, Wei M, Zinkel S 1999. Death and survival signals determine active/inactive conformations of proapoptotic BAX, BAD, and BID molecules. *Cold Spring*

Harb Symp Quant Biol 64:343-50.

Kreck C, Saller R 1999. Herbal drugs of foreign cultures and medical systems exemplified by Indian incense. Considerations regarding social and insurance medicine expert assessment. *Versicherungsmedizin* Sep 1;51(3):122-7.

Kreth FW, Berlis A, Spiropoulou V, Faist M, Scheremet R, Rossner R, Volk B, Ostertag CB 1999. The role of tumor resection in the treatment of glioblastoma multiforme in adults. *Cancer* 86 2117-2123.

Kreth FW, Warnke PC, Ostertag CB 1994. Low grade supratentorial astrocytomas: management and prognostic factors. *Cancer* 74:3247–3248.

Krieglstein CF, Anthoni C, Rijcken EJ, Laukötter M, Spiegel HU, Boden SE, Schweizer S, Safayhi H, Senninger N, Schürmann G 2001. Acetyl-11-keto-beta-boswellic acid, a constituent of a herbal medicine from *Boswellia serrata* resin, attenuates experimental ileitis. *Int J Colorectal Dis* Apr;16(2):88-95.

Krüger P, Daneshfar R, Eckert GP, Klein J, Volmer DA, Bahr U, Müller WE, Karas M, Schubert-Zsilavecz M, Abdel-Tawab M 2008. Metabolism of boswellic acids in vitro and in vivo. *Drug Metab Dispos* Jun 36(6):1135-42.

Krüger P, Kanzer J, Hummel J, Fricker G, Schubert-Zsilavecz M, Abdel-Tawab M 2009. Permeation of *Boswellia* extract in the Caco-2 model and possible interactions of its constituents KBA and AKBA with OATP1B3 and MRP2. *Eur J Pharm Sci* Feb15;36(2-3):275-84.

Langen KJ, Jarosch M, Muhlensiepen H, Hamacher K, Broer S, Jansen P, et al. 2003. Comparison of fluorotyrosines and methionine uptake in F98 rat gliomas. *Nucl Med Biol* 30:501-508.

Larsen AK, Gobert C 1999. DNA topoisomerase I in oncology: Dr Jekyll or Mr Hyde? *Pathol Oncol Res* 5(3):171-8.

Lauterbur PC 1980. Progress in n.m.r. zeugmatography imaging. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* Jun 25;289(1037):483-7.

Law M, Yang S, Wang H, et al. 2003. Glioma grading: sensitivity, specificity, and predictive values of perfusion MR imaging and proton MR spectroscopic imaging compared with conventional MR imaging. *AJNR* 24:1989-1998.

Laws ER, Parney IF, Huang W, Anderson F, Morris AM, Asher A, Lillehei KO, Bernstein M, Brem H, Sloan A, Berger MS, Chang S 2003. Glioma Outcomes Investigators Survival following surgery and prognostic factors for recently diagnosed malignant glioma: data from the Glioma Outcomes Project. *J Neurosurg* Sep 99(3):467-73.

Lee Y, Bullard DE, Humphrey PA, Colapinto EV, Friedman HS, Zalutsky MR, Coleman RE, Bigner DD 1988. Treatment of intracranial human glioma xenografts with ¹³¹I-labeled anti-tenascin monoclonal antibody 81C6. *Cancer Res* 48:2904 – 2910.

Leibel SA, Sheline GE 1987. Radiation therapy for neoplasms of the brain. *J Neurosurg*, 66:1-22.

Li J, Yen C, Liaw D 1997. PTEN, a putative protein tyrosin phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 275:1943-1947.

Liu J 1995. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J Ethnopharmacol* 49:57-68.

Logothetis NK, Pauls J, Augath M, Trinath T, Oeltermann A 2001. Neurophysiological investigation of the basis of the fMRI signal. *Nature* Jul 12;412(6843):150-7.

Lote K, Egeland T, Hager B, Stenwig B, Skullerud K, Berg Johnsen J, Storm Mathisen I, Hirschberg H 1997. Survival, prognostic factors, and therapeutic

efficacy in low-grade glioma: a retrospective study in 379 patients. *J Clin Oncol* 15:3129-3140.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A., Scheithauer BW, Kleihues P 2007. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol (Berl)* 114:97-109.

Love JA, Friden H, Ekstedt H 1984. Effect of corticosteroids at the Level of the arachnoid villi. In: K.G. Go und A. Baethmann (eds): Recent progress in the study and therapy of brain edema. New York, Plenum Press 589-595.

Machein MR, Plate KH 2000. VEGF in brain tumors. *J Neurooncol* Oct-Nov;50(1-2):109-20.

Mack DH, Vartikar J, Pipas JM, Laimins LA 1993. Specific repression of TATA-mediated but not initiator-mediated transcription by wild-type p53. *Nature* 363(6426):281-3.

Mahaley MS, Mettlin C, Natarajan N, Laws ER, Peace BB 1989. National survey of patterns of care for brain-tumor patients. *J Neurosurg* 71:826-36.

Mahato SB, Nandy AK, Roy G 1992. Triterpenoids, *Phytochemistry* 31:2199-2249.

Maron A, Gustin T, Le Roux A, Mottet I, Dedieu JF, Brion JP, Demeure R, Perricaudet M, Octave JN 1996. Gene therapy of rat C6 glioma using adenovirus-mediated transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene: long-term follow-up by magnetic resonance imaging. *Gene Ther* 3:315–322.

Mattern J, Büchler MW, Herr I 2007. Cell cycle arrest by glucocorticoids may protect normal tissue and solid tumors from cancer therapy. *Cancer Biol Ther* Sep;6(9):1345-54.

Mayhan WG 1999. VEGF increases permeability of the blood-brain barrier via a nitric oxide synthase/cGMP-dependent pathway. *Am J Physiol* May;276(5 Pt 1):C1148-53.

McKnight TR, von dem Bussche MH, Vigneron DB, et al. 2002. Histopathological validation of a three-dimensional magnetic resonance spectroscopy index as a predictor of tumor presence. *J Neurosurg* 97:794-802.

Mohapatra G, Kim DH, Feuerstein BG 1995. Detection of multiple gains and losses of genetic material in ten glioma cell lines by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosom Cancer* 13:86-93.

Mollenhauer J, Wiemann S, Scheurlen W 1997. DMBT1, a new member of the SRCR superfamily, on chromosome 10q25.3-26.1 is deleted in malignant brain tumors. *Nat Genet* 17:32-39.

Muleris M, Almeida A, Dutrillaux AM 1994. Oncogene amplification in human gliomas: a molecular cytogenetic analysis. *Oncogene* 9:2717-2722.

Nagano N, Sasaki H, Aoyagi M, Hirakawa K 1993. Invasion of experimental rat brain tumor: early morphological changes following microinjection of c6 glioma cells. *Acta Neuropathol* 86(2):117-25.

Nakamura M, Yang F, Fujisawa H, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H 2000. Loss of heterozygosity on chromosome 19 in secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 59:539-543.

Neglia JP, Meadows AT, Robison LL, Kim TH, Newton WA, Ruymann FB, Sather HN, Hammond GD 1991. Second neoplasms after acute lymphoblastic leukemia in childhood. *N Engl J Med* Nov 7;325(19):1330-6.

Nishikawa R, Ji XD, Harmon RC, Lazar CS, Gill GN, Caveness WK, Huang HJS 1994. A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma

confers enhanced tumorigenicity. PNAS 91:7727-7731 (USA).

Nitta T, Sato K 1995. Prognostic implications of the extent of surgical resection in patients with intracranial malignant gliomas. Cancer 75:2727-2731.

Ogawa S, Lee TM, Kay AR, Tank DW 1990. Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation. Proc Natl Acad Sci Dec 87(24):9868-72 (USA).

Ohgaki H, Kleihues P 2005. Epidemiology and ethiology of gliomas. Acta Neuropathol. 109(1):93-108.

Ohki R, Nemoto J, Murasawa H, Oda E, Inazawa J, Tanaka N, Taniguchi T 2000. Reprimo, a new candidate mediator of the p53-mediated cell cycle arrest at the G2 phase. J Biol Chem 275(30):22627-30.

Ohnishi T, Hayakawa T, Shapiro WR 1990. Human malignant gliomas secrete a factor that increases brain capillary permeability: role in peritumoural brain oedema. Acta Neurochirurgica 51:137-139.

Ohnishi T, Sher PB, Posner JB, Shapiro WR 1990. Capillary permeability factor secreted by malignant brain tumor. Role in peritumoral brain edema and possible mechanism for anti-edema effect of glucocorticoids. J Neurosurg Feb;72(2):245-51.

Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B 1992. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. Nature 358(6381):80-3.

Pang X, Yi Z, Zhang X, Sung B, Qu W, Lian X, Aggarwal BB, Liu M 2009. Acetyl-11-keto-beta-boswellic acid inhibits prostate tumor growth by suppressing vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis. Cancer Res Jul 15;69(14):5893-900.

Parente L, Di Rosea M, Flower RJ, Ghiara P, Meli R, Persico P, Salmon JA, Wood JN 1984. Relationship between the anti-phospholipase and anti-inflammatory effects of glucocorticoid-induced proteins. *Eur J Pharmacol* Mar 23;99(2-3):233-9.

Park YS, Lee JH, Harwalkar JA, Bondar J, Safayhi H, Golubic M 2002. Acetyl-11-keto-beta-boswellic acid (AKBA) is cytotoxic for meningioma cells and inhibits phosphorylation of the extracellular-signal regulated kinase 1 and 2. *Adv Exp Med Biol* 507:387-93.

Pauling L 1935. The Oxygen Equilibrium of Hemoglobin and Its Structural Interpretation. *Proc Natl Acad Sci* Apr;21(4):186-91 (USA).

Pawson T, Saxton TM 1999. Signaling networks – do all roads lead to the same genes? *Cell* 97:675-678.

Peng Q, Warloe T, Berg K, Moan J, Kongshaug M, Giercksky KE, Nesland JM 1997. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. Clinical research and future challenges. *Cancer* Jun 15;79(12):2282-308.

Peters-Golden M 1998. Molecular mechanisms of leukotriene synthesis: the changing paradigm. *Clin Exp Allergy* 28:1059-65.

Pfeiffer SE, Herschman HR, Lightbody J, Sato G 1970. Synthesis by a clonal line of rat glial cells of a protein unique to the nervous system. *Cell Physiol* Jun;75(3):329-39.

Pfund Z, Szapary L, Jaszberenyi O, Nagy F, Czopf J 1999. Headache in intracranial tumors. *Cephalalgia* 19:787-90.

Pilkington GJ, Lantos LP 1990. Pathology of experimental brain tumors. In: Thomas DG (eds.): *Neurooncology, primary malignant brain tumors*. Edward Arnold, 5-76.

Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W 1992. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* Oct 29;359(6398):845-8.

Pluquet O, Hainaut P 2001. Genotoxic and non-genotoxic pathways of p53 induction. *Cancer Lett* Dec 10;174(1):1-15.

Podolsky DK 2002. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* Aug 8;347(6):417-29.

Povlishock JT 2000. Pathophysiology of neural injury: therapeutic opportunities and challenges. *Clin Neurosurg* 46:113-26.

Proescholdt MA, Heiss JD, Walbridge S, Mühlhauser J, Capogrossi MC, Oldfield EH, Merrill MJ 1999. Vascular endothelial growth factor (VEGF) modulates vascular permeability and inflammation in rat brain. *J Neuropathol Exp Neurol* Jun;58(6):613.

Radhakrishnan K, Mokri B, Parisi JE, O'Fallon WM, Sunku J, Kurland LT 1995. The trends in incidence of primary brain tumors in the population of Rochester, Minnesota. *Ann Neurol* Jan;37(1):67-73.

Rajnikant GV, Rangari VD, Bapat SR, Agarwal RB, Gupta R 2001. Crystallographic analysis of acetyl β -boswellic acid. *Crystal Research and Technology* 36:93-100.

Rapoport SI 1976. *Blood–Brain Barrier in Physiology and Medicine*. Raven Press, New York.

Recio MC, Giner RM, Manez S, Rios JL 1995. Structural requirements for the anti-inflammatory activity of natural triterpenoids. *Planta Med* 61:182-185.

Reifenberger G, Ichimura K, Reifenberger J, Elkahloun AG, Meltzer PS, Collins

VP 1996a. Refined mapping of 12q13-q15 amplicons in human malignant gliomas suggests CDK4/SAS and MDM2 as independent amplification targets. *Cancer Res* 56:5141-5145.

Reifenberger G, Liu L, Ichimura K, Schmidt EE, Collins VP 1993. Amplification and overexpression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutation. *Cancer Res* 53:2736-2739.

Reifenberger G, Reifenberger J, Ichimura K, Meltzer PS, Collins VP 1994a. Amplification of multiple genes from chromosomal region 12q13-14 in human malignant gliomas: preliminary mapping of the amplicon shows preferential involvement of CDK4, SAS, and MDM2. *Cancer Res* 54:4299-4303.

Reifenberger J, Ring GU, Gies U, Cobbers MJL, Oberstrass J, An H-X, Niederacher D, Wechsler W, Reifenberger G 1996. Analysis of p53 mutation and epidermal growth factor receptor amplification in recurrent gliomas with malignant progression. *J Neuropathol Exp Neurol* 55:824-833.

Reising K, Meins J, Bastian B, Eckert G, Mueller WE, Schubert-Zsilavecz M, Abdel-Tawab M 2005. Determination of boswellic acids in brain and plasma by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal Chem* Oct 15;77(20):6640-5.

Reulen HJ, Huber P, Ito U, Gröger U 1990. Peritumoral brain edema. A keynote address. *Adv Neurol* 52:307-15.

Reyes-Mugica M, Rieger-Christ K, Ohgaki H 1997. Loss of DCC expression and glioma progression. *Cancer Res* 57:382-386.

Rios JL, Recio MC, Manez S, Giner RM 2000. Natural triterpenoids as anti-inflammatory agents. *Studies in Natural Products Chemistry*, Bd. 22 (Hrg.: Attatur-Rahman), Elsevier 93-143.

Ruzicka L, Wirz W 1939. Zur Kenntnis der Triterpene (50. Mitteilung), Umwandlung der β -Boswellinsäure in β -Amyrin. *Helv Chim Acta* 22:948-951.

Safayhi H, Boden SE, Schweizer S, Ammon HP 2000. Concentration-dependent potentiating and inhibitory effects of Boswellia extracts on 5-lipoxygenase product formation in stimulated PMNL. *Planta Med* 66:110-113.

Safayhi H, Mack T, Sabieraj J, Anazodo MI, Subramanian LR, Ammon HPT 1992. Boswellic acids: Novel, specific, nonredox inhibitors of 5-lipoxygenase. *J Pharmacol Exp Ther* 261:1143-1146.

Safayhi H, Rall B, Sailer ER, Ammon HTP 1997. Inhibition by boswellic acids of human leukocyte elastase. *J Pharmacol Exp Ther* 281(1):460-3.

Safayhi H, Sailer ER 1997. Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes. *Planta* 63(6):487-93.

Safayhi H, Sailer ER, Ammon HPT 1995. Mechanism of 5-lipoxygenase inhibition by acetyl-11-keto- β -boswellic acid: *Molecular Pharmacology* 47:1212-1216.

Sailer ER, Hoernlein RF, Ammon HPT, Safayhi H 1996. Structure-activity-relationships of 5-lipoxygenase-inhibition by boswellic acids. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 353:R43.

Sailer ER, Schweizer S, Boden SE, Ammon HP, Safayhi H 1998. Characterization of an acetyl-11-keto-beta-boswellic acid and arachidonate-binding regulatory site of 5-lipoxygenase using photoaffinity labeling. *Eur J Biochem* 256(2):364-8.

Samdani AF, Dawson TM, Dawson VL 1997. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. *Stroke* Jun 28(6):1283-8.

Samuelsson B 2000. The discovery of the leukotrienes. *Am J Respir Crit Care Med* 161(2 Pt 2):S2-6.

Samuelsson B, Dahlén SE, Lindgren JA, Rouzer CA, Serhan CN 1987. Leukotrienes and Lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science* Sep 4;237(4819):1171-6.

San Galli F, Vrignaud P, Robert J, Coindre JM, Cohadon F 1989. Assessment of the experimental model of transplanted C6 glioblastoma in Wistar rats. *J Neurooncol* 7:299-304.

Schackert G 1998. Neurochirurgische Therapie der malignen Gliome. *Onkologe* 4:599-607.

Schilling L, Wahl M 1997. Brain edema: pathogenesis and therapy. *Kidney Int Suppl* 59:S69-75.

Schilling L, Wahl M 1999. Mediators of cerebral edema. *Adv Exp Med Biol* 474:123-41.

Schlegel J, Merdes A, Stumm G, Albert FK, Forsting M, Hynes N, Kiessling M 1994. Amplification of the epidermal-growth-factor-receptor gene correlates with different growth behaviour in human glioblastoma. *Int J Cancer* 56;1:72-7.

Schlegel U, Westphal M 1998. *Neuroonkologie*. Stuttgart: Thieme.

Schmidt EE, Ichimura K, Reifenberger G, Collins VP 1994. CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion or CDK4 amplification occurs in the majority of glioblastomas. *Cancer Res* 54(24):6321-6324.

Schneider E, Hsiang Y 1990. DNA Topoisomerases as Anticancer Drug Targets: DNA gyrase and the supercoiling of DNA. *Advances in Pharmacology* 21:149-183.

Schröck E, Blume C, Meffert MC 1996. Recurrent gain of chromosome arm 7q in low-grade astrocytic tumors studied by comparative genomic hybridization. *Genes*

Chromosom Cancer 15:199-205.

Schröck E, Thiel G, Lozanova T 1994. Comparative genomic hybridisation of human malignant gliomas reveals multiple amplifications sites and nonrandom chromosomal gains and losses. *Am J Pathol* 144:1203-1218.

Schweizer S, Eichele K, Ammon HPT, Safayhi H 2000. 3-acetoxy group of genuine AKBA (acetyl-11-keto- β -boswellic acid) is α -configured. *Planta Medica* 66:781-782.

Schweizer S, von Brocke AF, Boden SE, Bayer E, Ammon HP, Safayhi H 2000. Workup-dependent formation of 5-lipoxygenase inhibitory boswellic acid analogues. *J Nat Prod* Aug 63(8):1058-61.

Scott JN, Rewcastle NB, Brasher PMA, Fulton D, Hagen NA, MacKinnon JA, Sutherland G, Caincross JG, Forsyth P 1998. Long-term glioblastoma multiforme survivors: A population based study. *Can J Neurol Sci* 25:197-201.

Sehested M, Jensen PB 1996. Mapping of DNA topoisomerase II poisons (etoposide, clerocidin) and catalytic inhibitors (aclerubicin, ICRF-187) to four distinct steps in the topoisomerase II catalytic cycle. *Biochemical Pharmacology* 51:879-886.

Seifert F, Gerhardt H 2001. Lebensqualität unter antientzündlicher Therapie mit dem Boswelliaserrata-Extrakt H15. *Med Welt* 52:3-8.

Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF 1983. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* Feb 25;219(4587):983-5.

Seregi A, Simmet T, Schobert A, Hertting G 1990. Characterization of cysteinyl-leukotriene formation in primary astroglial cell cultures. *J Pharm Pharmacol* 42:191-3.

Shao Y, Ho CT, Chin CK, Badmaev V, Ma W, Huag MT 1998. Inhibitory activity of boswellic acids from *Boswellia serrata* against human leukaemia HL-60 cells in culture. *Planta. Med* 64:328-331.

Shapiro JR 2002. Genetic alterations associated with adult diffuse astrocytic tumors, *Am J Med Genet* 115(3):194-201.

Shapiro WR, Green SB, Burger PC 1989. Randomized trial of three chemotherapy regimens and two radiotherapy regimens and two radiotherapy regimens in postoperative treatment of malignant glioma. Brain Tumor Cooperative Group Trial 8001. *Journal of Neurosurgery* 71:1-9.

Sharma S, Thawani V, Hingorani L, Shrivastava M, Bhate VR, Khiyani R 2004. Pharmacokinetic study of 11-Keto beta-Boswellic acid. *Phytomedicine* Feb;11(2-3):255-60.

Sheline GE 1977. Radiation therapy of brain tumors. *Cancer* 39:873-881.

Shimizu T, Takusagawa Y, Izumi T, Ohishi N, Seyama Y 1987. Enzymic synthesis of leukotriene B₄ in guinea pig brain. *Journal of Neurochemistry* 48:1541-1546.

Simmet T, Luck W, Delank WK, Peskar BA 1989. Biosynthesis of Cysteinyl-Leukotrienes by Human Brain Tissue in Vitro. *Advances in Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Research* 19:402-6.

Simmet T, Luck W, Winking M, Delank WK, Peskar BA 1990. Identification and Characterization of Cysteinyl-Leukotriene Formation in Tissue Slices from Human Intracranial Tumors: Evidence for Their Biosynthesis Under In Vivo Conditions. *J Neurochem* 54(6):2091-2099.

Simmet T, Tippler B 1991. On the relation between cerebral Cysteinyl-leukotrieneformation and epileptic seizures. *Brain Research* 540:283-286.

Simpson JR, Horton J, Scott C, Curran WJ, Rubin P, Fischbach J, Isaacson S, Rotman M, Asbell SO, Nelson JS, et al. 1993. Influence of location and extent of surgical resection on survival of patients with glioblastoma multiforme: results of three consecutive Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) clinical trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* May 20;26(2):239-44.

Singh GB, Attal CK 1986. Pharmacology of an extract of salai guggal ex-*Boswellia serrata*, a new non-steroidal anti-inflammatory agent. *Agents Actions* 18:407-412.

Singh GB, Bani S, Singh S 1996. Toxicity and safety evaluation of boswellic acids. *Phytomedicine* 3:87-90.

Singh GB, Singh S, Bani S 1996. Alcoholic extract of salai-guggal ex-*Boswellia serrata*, a new natural source NSAID. *Drugs of Today* 32(2):109-112.

Smith JS, Jenkins RB 2000. Genetic alterations in adult diffuse glioma: occurrence, significance and prognostic implications. *Front Biosci* 5:D213-D231.

Sonoda Y, Iizuka M, Yasuda J 1995. Loss of heterozygosity at 11p15 in malignant glioma. *Cancer Res* 55:2166-2168.

Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA 1997. Identification of a candidate tumor suppressor gene, MMAC, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* 15:356-362.

Sterk V, Büchele B, Simmet T 2004. Effect of food intake on the bioavailability of boswellic acids from a herbal preparation in healthy volunteers. *Planta Med* Dec; 70(12):1155-60.

Stewart PA, Hayakawa K, Farrell CL, Del Maestro RF 1987. Quantitative study of microvessel ultrastructure in human peritumoral brain tissue. Evidence for a blood-brain barrier defect. *J Neurosurg* Nov;67(5):697-705.

Streffler JR, Bitzer M, Schabet M, Dichgans J, Weller M 2001. Response of radiochemotherapy associated cerebral edema to a phytotherapeutic agent, H15. *Neurology* 56:1219-1221.

Stummer W 2007. Mechanisms of tumor-related brain edema. *Neurosurg Focus* May 15;22(5):E8.

Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen HJ; ALA-Glioma Study Group 2006. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol* May;7(5):392-401.

Stupp R, Dietrich PY, Ostermann Kraljevic S, Pica A, Maillard I, Maeder P, Meuli R, Janzer R, Pizzolato G, Miralbell R, Porchet F, Regli L, de Tribolet N, Mirimanoff RO, Leyvraz S 2002. Promising survival for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with concomitant radiation plus temozolomide followed by adjuvant temozolomide. *J Clin Oncol* Mar 1;20(5):1375-82.

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ et al. 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352:987-996.

Sugawa N, Ekstrand AJ, James CD, Collins VP 1990. Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas. *PNAS* 87:8602-8606. (USA)

Sullivan D, Latham M, Ross W 1987. Proliferation-dependent topoisomerase II content as a determinant of antineoplastic drug action in human, mouse, and Chinese hamster ovary cells. *Cancer Research* 47:3973-3979.

Syrovets T, Buchele B, Gedig E, Slupsky JR, Simmet T 2000. Acetyl-boswellic acids are novel catalytic inhibitors of human topoisomerases I and Iia. *Mol Pharmacol* 58:71-81.

Tanaka S, Kobayashi I, Oka H 2001. Drug-resistance gene expression and progression of astrocytic tumors. *Brain Tumor Pathol* 18(2):131-137.

Tao W, Levine AJ 1999. P19(ARF) stabilizes p53 by blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of Mdm2. *Proc Natl Acad Sci* 96(12):6937-41. (USA)

Tarbit MH, Berman J 1998. High-throughput approaches for evaluating absorption, distribution, metabolism and excretion properties of lead compounds. *Curr Opin Chem Biol Jun* 2(3):411-6.

Teng DH, Hu R, Lin H, Davis T, Iliev D, Frye C, Swedlund B, Hansen KL, Vinson VL, Gumpfer KL, Ellis L, El-Naggar A, Frazier M, Jasser S, Langford LA, Lee J, Mills GB, Pershouse MA, Pollack RE, Tornøsen C, Troncoso C, Yung WK, Fujii G, Berson A, Steck PA, et al. 1997. MMAC1/PTEN mutations in primary tumor specimens and tumor cell lines. *Cancer* Dec 1;57(23):5221-5.

Teuscher E 1997. *Biogene Arzneimittel*, vol. 5., überarbeitete und erweiterte Auflage. Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart.

Tschampa HJ, Mürzt P, Flacke S, Paus S, Schild HH, Urbach H 2003. Thalamic involvement in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: a diffusion-weighted MR imaging study. *Am J Neuroradiol* May 24(5):908-15.

Tschirch A 1900, *Die Harze und die Harzbehälter*, Bornträger, Leipzig.

Tschirch A, Halbey O 1898. Untersuchungen über die Sekrete. 28. Über das Olibanum. *Arch Pharm* 236:487-503.

Ueki K, Ono Y, Henson JW, Erd JT, Deimling A von, Louis DN 1996. CDKN2/p16 or RB alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated. *Cancer Res* 56:150-153.

Uematsu H, Maeda M, Itoh H 2003. Peritumoral brain edema in intracranial

meningiomas evaluated by dynamic perfusion-weighted MR imaging: a preliminary study. *Eur Radiol* Apr;13(4):758-62.

Uhm JH, Dooley NP, Villemure JG, Yong VW 1997. Mechanisms of glioma invasion: role of matrix-metalloproteinases. *The Canadian Journal of Neurological Sciences* 24:3-15.

Unterberg AW, Stroop R, Thomale UW, Kiening KL, Päuser S, Vollmann W 1997. Characterisation of brain edema following "controlled cortical impact injury" in rats. *Acta Neurochir Suppl* 70:106-8.

Vajkoczy P, Schilling L, Ullrich A, Schmiedek P, Menger MD 1998. Characterization of angiogenesis and microcirculation of high-grade glioma: an intravital multifluorescence microscopic approach in the athymic nude mouse. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 18:510-520.

Vane JR 1971. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of activation for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* 231:232-235.

Velu TJ, Beguinot L, Vass WC, Willingham MC, Merlino GT, Pastan I, Lowy DR 1987. Epidermal-growth-factor-dependent transformation by a human EGF receptor protooncogene. *Science* Dec 4;238(4832):1408-10.

Vuorinen V, Hinkka S, Färkkilä M, Jääskeläinen J 2003. Debulking or biopsy of malignant glioma in elderly people - a randomised study. *Acta Neurochir (Wien)* Jan 145(1):5-10.

Vuorinen V, Hinkka S, Färkkilä M, Jääskeläinen J 2003. Debulking or biopsy of malignant glioma in elderly people - a randomised study. *Acta Neurochir (Wien)* Jan 145(1):5-10.

Walker MD, Green SB, Byar DP, Alexander E, Batzdorf U, Brooks WH, Hunt WE, MacCarty CS, Mahaley MS Jr, Mealey J Jr, Owens G, Ransohoff J 2nd,

Robertson JT, Shapiro WR, Smith KR Jr, Wilson CB, Strike TA 1980. Randomized comparison of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery. *N Engl J Med* Dec 4;303(23):1323-9.

Wallner KE, Galicich JH, Malkin MG, Arbit E, Krol G, Rosenblum MK 1989. Inability of computed tomography appearance of recurrent malignant astrocytoma to predict survival following reoperation. *J Clin Oncol* Oct 7(10):1492-6.

Wallner KE, Galicich JH, Krol G, Arbit E, Malkin MG 1989. Patterns of failure following treatment for glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* Jun;16(6):1405-9.

Wang H, Oliver P, Zhang Z, Agrawal S, Zhang R 2003. Chemosensitization and radiosensitization of human cancer by antisense anti-MDM2 oligonucleotides: in vitro and in vivo activities and mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 1002:217-35.

Wang J. 1996. DNA Topoisomerases. *Annual review of biochemistry* 65:635-692.

Warmuth-Metz M 2003. Postoperative imaging after brain tumor resection. *Acta Neurochir Suppl* 88:13-20.

Watanabe K, Tachibana O, Sato K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H 1996. Overexpression of EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol* 6:217-223.

Weber RG, Sabel M, Reifenberger J, Sommer C, Oberstrass J, Reifenberger G, Kiessling M, Cremer T 1996. Characterization of genomic alterations associated with glioma progression by comparative genomic hybridization. *Oncogene* 13:983-994.

Weeks A 2003. The Molecular Systematics and Biogeography of the Burseraceae, Dissertation, University of Texas, Austin.

Weinberg RA 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* May 5;81(3):323-30.

Weller M, Müller B, Koch R, Bamberg M, Krauseneck P; Neuro-Oncology Working Group of the German Cancer Society 2003. Neuro-Oncology Working Group 01 trial of nimustine plus teniposide versus nimustine plus cytarabine chemotherapy in addition to involved-field radiotherapy in the first-line treatment of malignant glioma. *J Clin Oncol* Sep 1;21(17):3276-84.

Weller M, Trepel M, Gimmel C, Schabet M, Bremen D, Krajewski S, Reed JC 1997. Hypericin-induced apoptosis of human malignant glioma cells is light dependent, independent of bcl-2 expression, and does not require wild-type p53. *Neurol Res* 19(5):459-470.

Westcott JY, Maxey KM, MacDonald J, Wenzel SE 1998. Immunoaffinity resin for purification of urinary leukotriene E4. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* Apr;55(5-6):301-21.

Westphal M, Hilt DC, Bortey E, Delavault P, Olivares R, Warnke PC, Whittle IR, Jääskeläinen J, Ram Z 2003. A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro Oncol* Apr;5(2):79-88.

Whittle IR, Macarthur DC, Malcolm GP, Li M, Washington K, Ironside JW 1998. Can experimental models of rodent implantation glioma be improved? A study of pure and mixed glioma cell line tumours. *J Neurooncol* 36:231–242.

Winger MJ, Macdonald DR, Cairncross JG 1989. Supratentorial anaplastic gliomas in adults. The prognostic importance of extent of resection and prior low-grade glioma. *J Neurosurg* Oct 71(4):487-93.

Winking M, Deinsberger W, Joedicke A, Boeker DK 1998. Cysteinyl-leukotriene levels in intracerebral hemorrhage: an edema-promoting factor?

Cerebrovasc Dis 8:318-26.

Winking M, Heldt RM, Simmet T 1996. Thrombin stimulates activation of the cerebral 5-lipoxygenase pathway during blood-brain cell contact. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:737-45.

Winking M, Sarikaya S, Rahmanian A, Jödicke A, Böker DK 2000. Boswellic acids inhibit glioma growth: a new treatment option? *Journal of Neuro-Oncology* 46:97-1003.

Winterstein A, Stein G 1932. Untersuchungen in der Saponinreihe. Zur Kenntnis der Mono-oxy-triterpensäuren. *Hoppe SZ Physiol Chem* 208:9-25.

Wrensch M, Minny Y, Chew T, Bondy M, Berger MS 2002. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neuro-oncology* 4:278-99.

Wu D, Wallen HD, Inohara N, Nuñez G 1997. Interaction and regulation of the *Caenorhabditis elegans* death protease CED-3 by CED-4 and CED-9. *J Biol Chem* 272(34):21449-54.

Xu R, Fazio GC, Matsuda SPT 2004. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *Phytochem* 65:261-291.

Yasuma Y, Strasser A, Ruetzel C, McCarron RM, Spatz M 1997. The effect of nitric oxide inhibition on ischemic brain edema. *Acta Neurochir Suppl* 70:202-5.

Yu D, Khan E, Khaleque MA, Lee J, Laco G, Kohlhagen G, Kharbanda S, Cheng YC, Pommier Y, Bharti A 2004. Phosphorylation of DNA topoisomerase I by the c-Abl tyrosine kinase confers camptothecin sensitivity. *J Biol Chem* Dec 10;279(50):51851-61.

Yu SK, Chalmers AJ 2007. Patients receiving standard-dose temozolomide

therapy are at risk of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 19(8):631-2.

Zhang C, Wenger T, Mattern J, Ilea S, Frey C, Gutwein P, Altevogt P, Bodenmüller W, Gassler N, Schnabel PA, Dienemann H, Marmé A, Hohenfellner M, Haferkamp A, Pfitzenmaier J, Gröne HJ, Kolb A, Büchler P, Büchler M, Friess H, Rittgen W, Edler L, Debatin KM, Krammer PH, Rutz HP, Herr I 2007. Clinical and mechanistic aspects of glucocorticoid-induced chemotherapy resistance in the majority of solid tumors. *Cancer Biol Ther* Feb;6(2):278-87.

Zülch KJ 1979. Histological typing of tumours of the central nervous system. International histological classification of tumours. No. 21(1st ed).WHO Genf.

Ehrenamtliche Erklärung

Ich erkläre: „Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus Liebig Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Sevgi Sarikaya-Seiwert

Düsseldorf, 21. November 2009

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen meinen Dank auszusprechen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. D.-K. Böker für die Möglichkeit, diese experimentelle Arbeit an der von ihm geführten Neurochirurgischen Klinik der Justus-Liebig-Universität Gießen durchzuführen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. M. Winking für die Überlassung des interessanten Themas. Er lehrte mich wissenschaftlich zu arbeiten und stand mir mit seiner hohen fachlichen Kompetenz zur Seite.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank Herrn PD Dr. Ulf Nestler, der mit vielen wertvollen Tipps zum Verfassen dieser Arbeit beitrug. Er schaffte jederzeit durch seine herzliche und freundschaftliche Art eine Arbeitsatmosphäre, unter der das Arbeiten sehr viel Freude machte.

10 Anhang

10.1 Protokolle

Gruppe A (240 mg/kg Körpergewicht)

	Fluchtreaktion										Schnelligkeit										Neurologisches Defizit										Aggressivität									
Tiere	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Tage																																								
1	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
6	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
7	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
8	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
9	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
10	4	4	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
11	3	3	3	4	3	3	4	3	4	3	4	3	3	4	3	3	4	3	4	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	3	4	4	3	3	4	3	3	
12	3	3	3	3	3	3	4	3	4	3	4	3	3	3	3	3	4	3	4	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	3	3	3	3	3	4	3	3	3	
13	4	3	3	3	3	3	4	3	3	3	4	3	3	3	3	4	3	3	3	4	3	3	4	4	4	4	4	4	4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
14	4	4	3	3	3	3	4	3	3	3	4	3	3	3	3	4	3	3	3	4	3	3	4	4	4	4	4	4	4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	

Gruppe B (120 mg/kg Körpergewicht)

	Fluchtreaktion										Schnelligkeit										Neurologisches Defizit										Aggressivität										
Tiere	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Tage																																									
1	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
6	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
7	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
8	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
9	4	4	3	4	4	3	4	4	4	4	4	4	3	4	3	4	4	4	4	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	3	4	4	4	3	4	4	4	4
10	4	4	3	4	3	3	3	4	4	3	4	3	3	3	4	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
11	3	3	3	4	3	3	3	3	4	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	3	2	3	3	2	3	3	3	3	
12	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	2	3	3	3	3	3	4	4	3	4	4	4	4	3	4	4	3	2	2	2	3	3	2	3	3	3	
13	3	3	2	3	3	2	3	2	3	2	3	2	2	2	2	3	3	2	2	2	4	4	3	4	4	4	4	3	4	4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
14	3	3	2	3	3	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	4	3	3	4	4	4	4	3	4	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

Gruppe C (60 mg/kg Körpergewicht)

	Fluchtreaktion										Schnelligkeit										Neurologisches Defizit										Aggressivität									
Tiere	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Tage																																								
1	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
6	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
7	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
8	3	4	4	3	3	3	3	4	4	4	3	4	4	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	3	3	3	4	3	3	3	3	
9	3	4	3	3	3	3	3	4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	2	3	2	3	2	3	3	3	
10	3	4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	2	2	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	2	2	2	3	3	2	2	3	2
11	2	3	3	2	2	3	3	3	3	3	2	3	3	2	2	2	2	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	2	2	2	2	2	3	2	2	2	2
12	2	3	3	2	2	2	3	3	3	3	2	3	2	2	2	2	2	2	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2
13	2	3	2	2	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	4	4	3	4	3	3	4	4	4	4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
14	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	4	4	3	3	3	3	4	4	4	4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

Gruppe D (Kontrollgruppe)

	Fluchtreaktion										Schnelligkeit										Neurologisches Defizit										Aggressivität									
Tiere	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Tage																																								
1	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
6	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
7	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
8	3	4	4	3	3	3	3	4	4	4	3	4	4	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
9	3	3	3	3	3	3	3	4	3	4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	2	2	2	3	3	3	3	3	
10	3	3	3	3	3	3	3	3	4	3	3	3	3	3	3	2	2	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	2	2	2	3	3	2	2	2	
11	2	3	3	2	2	3	3	3	3	3	2	3	2	2	2	2	2	2	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
12	2	3	3	2	2	2	3	3	3	3	2	3	2	2	2	2	2	2	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	2	2	3	2	2	2	2	2	2	
13	2	2	2	2	2	2	2	3	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	4	4	3	4	3	4	4	4	4	4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
14	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	4	4	3	3	3	3	4	4	4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	

10.2 Auswertung

10.2.1 Fluchtreaktion

Gruppe * Fluchtreaktion 8 Tage Kreuztabelle

			Fluchtreaktion 8 Tage		Gesamt
			3	4	3
Gruppe	A (240mg/kg)	Anzahl	0	10	10
		% von Gruppe	,0%	100,0%	100,0%
	B (120mg/kg)	Anzahl	0	10	10
		% von Gruppe	,0%	100,0%	100,0%
	C (60mg/kg)	Anzahl	5	5	10
		% von Gruppe	50,0%	50,0%	100,0%
	D (Kontrolle)	Anzahl	5	5	10
		% von Gruppe	50,0%	50,0%	100,0%
Gesamt		Anzahl	10	30	40
		% von Gruppe	25,0%	75,0%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (1- seitig)	Punkt- Wahrscheinlich keit
Chi-Quadrat nach Pearson	13,333(a)	3	,004	,003		
Kontinuitätskorrektur						
Likelihood-Quotient	17,261	3	,001	,001		
Exakter Test nach Fisher	12,985			,003		
Zusammenhang linear-mit-linear	10,400(b)	1	,001	,001	,001	,001
Anzahl der gültigen Fälle	40					

a 4 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 2,50.

b Die standardisierte Statistik ist -3,225.

=> Signifikante Abhängigkeit zwischen den Gruppen (Dosen) und der Bewertung der Fluchtreaktion nach 8 Tagen (Chi-Quadrat-Test auf linearen Trend, exakt, $p=0,001$)

Gruppe * Fluchtreaktion 9 Tage Kreuztabelle

		Fluchtreaktion 9 Tage		Gesamt
		3	4	3
Gruppe	A (240mg/kg)	Anzahl	0	10
		% von Gruppe	,0%	100,0%
	B (120mg/kg)	Anzahl	2	10
		% von Gruppe	20,0%	80,0%
	C (60mg/kg)	Anzahl	8	10
		% von Gruppe	80,0%	20,0%
	D (Kontrolle)	Anzahl	8	10
		% von Gruppe	80,0%	20,0%
Gesamt		Anzahl	18	22
		% von Gruppe	45,0%	55,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (1- seitig)	Punkt- Wahrscheinlich keit
Chi-Quadrat nach Pearson	20,606(a)	3	,000	,000		
Kontinuitätskorrektur						
Likelihood-Quotient	25,027	3	,000	,000		
Exakter Test nach Fisher	21,222			,000		
Zusammenhang linear-mit-linear	17,727(b)	1	,000	,000	,000	,000
Anzahl der gültigen Fälle	40					

a 4 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 4,50.

b Die standardisierte Statistik ist -4,210.

=> Signifikante Abhängigkeit zwischen den Gruppen (Dosen) und der Bewertung der Fluchtreaktion nach 9 Tagen (Chi-Quadrat-Test auf linearen Trend, exakt, $p < 0,001$)

Gruppe * Fluchtreaktion 10 Tage Kreuztabelle

			Fluchtreaktion 10 Tage		Gesamt
			3	4	3
Gruppe	A (240mg/kg)	Anzahl	1	9	10
		% von Gruppe	10,0%	90,0%	100,0%
	B (120mg/kg)	Anzahl	5	5	10
		% von Gruppe	50,0%	50,0%	100,0%
	C (60mg/kg)	Anzahl	9	1	10
		% von Gruppe	90,0%	10,0%	100,0%
	D (Kontrolle)	Anzahl	9	1	10
		% von Gruppe	90,0%	10,0%	100,0%
Gesamt		Anzahl	24	16	40
		% von Gruppe	60,0%	40,0%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (1- seitig)	Punkt- Wahrscheinlich keit
Chi-Quadrat nach Pearson	18,333(a)	3	,000	,000		
Kontinuitätskorrektur						
Likelihood-Quotient	20,473	3	,000	,000		
Exakter Test nach Fisher	18,100			,000		
Zusammenhang linear-mit-linear	15,925(b)	1	,000	,000	,000	,000
Anzahl der gültigen Fälle	40					

a 4 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 4,00.

b Die standardisierte Statistik ist -3,991.

=> Signifikante Abhängigkeit zwischen den Gruppen (Dosen) und der Bewertung der Fluchtreaktion nach 10 Tagen (Chi-Quadrat-Test auf linearen Trend, exakt, $p < 0,001$)

Gruppe * Fluchtreaktion 11 Tage Kreuztabelle

			Fluchtreaktion 11 Tage			Gesamt
			2	3	4	2
Gruppe	A (240mg/kg)	Anzahl	0	7	3	10
		% von Gruppe	,0%	70,0%	30,0%	100,0%
	B (120mg/kg)	Anzahl	0	8	2	10
		% von Gruppe	,0%	80,0%	20,0%	100,0%
	C (60mg/kg)	Anzahl	3	7	0	10
		% von Gruppe	30,0%	70,0%	,0%	100,0%
	D (Kontrolle)	Anzahl	3	7	0	10
		% von Gruppe	30,0%	70,0%	,0%	100,0%
Gesamt		Anzahl	6	29	5	40
		% von Gruppe	15,0%	72,5%	12,5%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (1- seitig)	Punkt- Wahrscheinlich keit
Chi-Quadrat nach Pearson	11,503(a)	6	,074	,069		
Kontinuitätskorrektur						
Likelihood-Quotient	15,552	6	,016	,026		
Exakter Test nach Fisher	9,880			,050		
Zusammenhang linear-mit-linear	9,399(b)	1	,002	,002	,001	,001
Anzahl der gültigen Fälle	40					

a 8 Zellen (66,7%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 1,25.

b Die standardisierte Statistik ist -3,066.

=> Signifikante Abhängigkeit zwischen den Gruppen (Dosen) und der Bewertung der Fluchtreaktion nach 11 Tagen (Chi-Quadrat-Test auf linearen Trend, exakt, $p=0,002$)

Gruppe * Fluchtreaktion 12 Tage Kreuztabelle

			Fluchtreaktion 12 Tage			Gesamt
			2	3	4	2
Gruppe	A (240mg/kg)	Anzahl	0	8	2	10
		% von Gruppe	,0%	80,0%	20,0%	100,0%
	B (120mg/kg)	Anzahl	1	9	0	10
		% von Gruppe	10,0%	90,0%	,0%	100,0%
	C (60mg/kg)	Anzahl	4	6	0	10
		% von Gruppe	40,0%	60,0%	,0%	100,0%
	D (Kontrolle)	Anzahl	4	6	0	10
		% von Gruppe	40,0%	60,0%	,0%	100,0%
Gesamt		Anzahl	9	29	2	40
		% von Gruppe	22,5%	72,5%	5,0%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (1- seitig)	Punkt- Wahrscheinlich keit
Chi-Quadrat nach Pearson	12,598(a)	6	,050	,031		
Kontinuitätskorrektur						
Likelihood-Quotient	14,054	6	,029	,033		
Exakter Test nach Fisher	9,887			,047		
Zusammenhang linear-mit-linear	8,797(b)	1	,003	,003	,002	,001
Anzahl der gültigen Fälle	40					

a. 8 Zellen (66,7%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist ,50.

b. Die standardisierte Statistik ist -2,966.

=> Signifikante Abhängigkeit zwischen den Gruppen (Dosen) und der Bewertung der Fluchtreaktion nach 12 Tagen (Chi-Quadrat-Test auf linearen Trend, exakt, $p=0,003$)

Gruppe * Fluchtreaktion 13 Tage Kreuztabelle

			Fluchtreaktion 13 Tage			Gesamt
			2	3	4	2
Gruppe	A (240mg/kg)	Anzahl	0	8	2	10
		% von Gruppe	,0%	80,0%	20,0%	100,0%
	B (120mg/kg)	Anzahl	4	6	0	10
		% von Gruppe	40,0%	60,0%	,0%	100,0%
	C (60mg/kg)	Anzahl	8	2	0	10
		% von Gruppe	80,0%	20,0%	,0%	100,0%
	D (Kontrolle)	Anzahl	8	2	0	10
		% von Gruppe	80,0%	20,0%	,0%	100,0%
Gesamt		Anzahl	20	18	2	40
		% von Gruppe	50,0%	45,0%	5,0%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (1- seitig)	Punkt- Wahrscheinlich keit
Chi-Quadrat nach Pearson	20,800(a)	6	,002	,000		
Kontinuitätskorrektur						
Likelihood-Quotient	24,971	6	,000	,000		
Exakter Test nach Fisher	19,651			,000		
Zusammenhang linear-mit-linear	16,217(b)	1	,000	,000	,000	,000
Anzahl der gültigen Fälle	40					

a. 8 Zellen (66,7%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist ,50.

b. Die standardisierte Statistik ist -4,027.

=> Signifikante Abhängigkeit zwischen den Gruppen (Dosen) und der Bewertung der Fluchtreaktion nach 13 Tagen (Chi-Quadrat-Test auf linearen Trend, exakt, $p < 0,001$)

Gruppe * Fluchtreaktion 14 Tage Kreuztabelle

			Fluchtreaktion 14 Tage			Gesamt
			2	3	4	2
Gruppe	A (240mg/kg)	Anzahl	0	7	3	10
		% von Gruppe	,0%	70,0%	30,0%	100,0%
	B (120mg/kg)	Anzahl	5	5	0	10
		% von Gruppe	50,0%	50,0%	,0%	100,0%
	C (60mg/kg)	Anzahl	10	0	0	10
		% von Gruppe	100,0%	,0%	,0%	100,0%
	D (Kontrolle)	Anzahl	9	1	0	10
		% von Gruppe	90,0%	10,0%	,0%	100,0%
Gesamt		Anzahl	24	13	3	40
		% von Gruppe	60,0%	32,5%	7,5%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (1- seitig)	Punkt- Wahrscheinlich keit
Chi-Quadrat nach Pearson	29,410(a)	6	,000	,000		
Kontinuitätskorrektur						
Likelihood-Quotient	36,702	6	,000	,000		
Exakter Test nach Fisher	27,750			,000		
Zusammenhang linear-mit-linear	20,519(b)	1	,000	,000	,000	,000
Anzahl der gültigen Fälle	40					

a 8 Zellen (66,7%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist ,75.

b Die standardisierte Statistik ist -4,530.

=> Signifikante Abhängigkeit zwischen den Gruppen (Dosen) und der Bewertung der Fluchtreaktion nach 14 Tagen (Chi-Quadrat-Test auf linearen Trend, exakt, $p < 0,001$)

10.2.2 Antrieb

Gruppe * Antrieb 8 Tage Kreuztabelle

			Schnelligkeit 8 Tage		Gesamt
			3	4	3
Gruppe	A (240mg/kg)	Anzahl	0	10	10
		% von Gruppe	,0%	100,0%	100,0%
	B (120mg/kg)	Anzahl	0	10	10
		% von Gruppe	,0%	100,0%	100,0%
	C (60mg/kg)	Anzahl	7	3	10
		% von Gruppe	70,0%	30,0%	100,0%
	D (Kontrolle)	Anzahl	7	3	10
		% von Gruppe	70,0%	30,0%	100,0%
Gesamt		Anzahl	14	26	40
		% von Gruppe	35,0%	65,0%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (1- seitig)	Punkt- Wahrscheinlich keit
Chi-Quadrat nach Pearson	21,538(a)	3	,000	,000		
Kontinuitätskorrektur						
Likelihood-Quotient	27,361	3	,000	,000		
Exakter Test nach Fisher	21,992			,000		
Zusammenhang linear-mit-linear	16,800(b)	1	,000	,000	,000	,000
Anzahl der gültigen Fälle	40					

a 4 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 3,50.

b Die standardisierte Statistik ist -4,099.

=> Signifikante Abhängigkeit zwischen den Gruppen (Dosen) und der Bewertung der Schnelligkeit nach 8 Tagen (Chi-Quadrat-Test auf linearen Trend, exakt, $p < 0,001$)

Gruppe * Antrieb 9 Tage Kreuztabelle

			Schnelligkeit 9 Tage		Gesamt
			3	4	3
Gruppe	A (240mg/kg)	Anzahl	0	10	10
		% von Gruppe	,0%	100,0%	100,0%
	B (120mg/kg)	Anzahl	3	7	10
		% von Gruppe	30,0%	70,0%	100,0%
	C (60mg/kg)	Anzahl	10	0	10
		% von Gruppe	100,0%	,0%	100,0%
	D (Kontrolle)	Anzahl	10	0	10
		% von Gruppe	100,0%	,0%	100,0%
Gesamt		Anzahl	23	17	40
		% von Gruppe	57,5%	42,5%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (1- seitig)	Punkt- Wahrscheinlich keit
Chi-Quadrat nach Pearson	31,407(a)	3	,000	,000		
Kontinuitätskorrektur						
Likelihood-Quotient	42,331	3	,000	,000		
Exakter Test nach Fisher	34,035			,000		
Zusammenhang linear-mit-linear	27,310(b)	1	,000	,000	,000	,000
Anzahl der gültigen Fälle	40					

a. 4 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 4,25.

b. Die standardisierte Statistik ist -5,226.

=> Signifikante Abhängigkeit zwischen den Gruppen (Dosen) und der Bewertung der Schnelligkeit nach 9 Tagen (Chi-Quadrat-Test auf linearen Trend, exakt, $p < 0,001$)

Gruppe * Antrieb 10 Tage Kreuztabelle

			Schnelligkeit 10 Tage			Gesamt
			2	3	4	2
Gruppe	A (240mg/kg)	Anzahl	0	0	10	10
		% von Gruppe	,0%	,0%	100,0%	100,0%
	B (120mg/kg)	Anzahl	0	6	4	10
		% von Gruppe	,0%	60,0%	40,0%	100,0%
	C (60mg/kg)	Anzahl	3	7	0	10
		% von Gruppe	30,0%	70,0%	,0%	100,0%
	D (Kontrolle)	Anzahl	2	8	0	10
		% von Gruppe	20,0%	80,0%	,0%	100,0%
Gesamt		Anzahl	5	21	14	40
		% von Gruppe	12,5%	52,5%	35,0%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (1- seitig)	Punkt- Wahrscheinlich keit
Chi-Quadrat nach Pearson	31,924(a)	6	,000	,000		
Kontinuitätskorrektur						
Likelihood-Quotient	41,567	6	,000	,000		
Exakter Test nach Fisher	31,292			,000		
Zusammenhang linear-mit-linear	21,240(b)	1	,000	,000	,000	,000
Anzahl der gültigen Fälle	40					

a 8 Zellen (66,7%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 1,25.

b Die standardisierte Statistik ist -4,609.

=> Signifikante Abhängigkeit zwischen den Gruppen (Dosen) und der Bewertung der Schnelligkeit nach 10 Tagen (Chi-Quadrat-Test auf linearen Trend, exakt, $p < 0,001$)

Gruppe * Antrieb 11 Tage Kreuztabelle

			Schnelligkeit 11 Tage			Gesamt
			2	3	4	2
Gruppe	A (240mg/kg)	Anzahl	0	7	3	10
		% von Gruppe	,0%	70,0%	30,0%	100,0%
	B (120mg/kg)	Anzahl	1	9	0	10
		% von Gruppe	10,0%	90,0%	,0%	100,0%
	C (60mg/kg)	Anzahl	5	5	0	10
		% von Gruppe	50,0%	50,0%	,0%	100,0%
	D (Kontrolle)	Anzahl	6	4	0	10
		% von Gruppe	60,0%	40,0%	,0%	100,0%
Gesamt		Anzahl	12	25	3	40
		% von Gruppe	30,0%	62,5%	7,5%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (1- seitig)	Punkt- Wahrscheinlich keit
Chi-Quadrat nach Pearson	20,027(a)	6	,003	,001		
Kontinuitätskorrektur						
Likelihood-Quotient	21,895	6	,001	,001		
Exakter Test nach Fisher	15,865			,002		
Zusammenhang linear-mit-linear	14,443(b)	1	,000	,000	,000	,000
Anzahl der gültigen Fälle	40					

a. 8 Zellen (66,7%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist ,75.

b. Die standardisierte Statistik ist -3,800.

=> Signifikante Abhängigkeit zwischen den Gruppen (Dosen) und der Bewertung der Schnelligkeit nach 11 Tagen (Chi-Quadrat-Test auf linearen Trend, exakt, $p < 0,001$)

Gruppe * Antrieb 12 Tage Kreuztabelle

			Schnelligkeit 12 Tage			Gesamt
			2	3	4	2
Gruppe	A (240mg/kg)	Anzahl	0	8	2	10
		% von Gruppe	,0%	80,0%	20,0%	100,0%
	B (120mg/kg)	Anzahl	2	8	0	10
		% von Gruppe	20,0%	80,0%	,0%	100,0%
	C (60mg/kg)	Anzahl	8	2	0	10
		% von Gruppe	80,0%	20,0%	,0%	100,0%
	D (Kontrolle)	Anzahl	8	2	0	10
		% von Gruppe	80,0%	20,0%	,0%	100,0%
Gesamt		Anzahl	18	20	2	40
		% von Gruppe	45,0%	50,0%	5,0%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (1- seitig)	Punkt- Wahrscheinlich keit
Chi-Quadrat nach Pearson	24,533(a)	6	,000	,000		
Kontinuitätskorrektur						
Likelihood-Quotient	28,423	6	,000	,000		
Exakter Test nach Fisher	22,732			,000		
Zusammenhang linear-mit-linear	18,582(b)	1	,000	,000	,000	,000
Anzahl der gültigen Fälle	40					

a. 8 Zellen (66,7%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist ,50.

b. Die standardisierte Statistik ist -4,311.

=> Signifikante Abhängigkeit zwischen den Gruppen (Dosen) und der Bewertung der Schnelligkeit nach 12 Tagen (Chi-Quadrat-Test auf linearen Trend, exakt, $p < 0,001$)

Gruppe * Antrieb 13 Tage Kreuztabelle

			Schnelligkeit 13 Tage			Gesamt
			2	3	4	2
Gruppe	A (240mg/kg)	Anzahl	0	8	2	10
		% von Gruppe	,0%	80,0%	20,0%	100,0%
	B (120mg/kg)	Anzahl	6	4	0	10
		% von Gruppe	60,0%	40,0%	,0%	100,0%
	C (60mg/kg)	Anzahl	9	1	0	10
		% von Gruppe	90,0%	10,0%	,0%	100,0%
	D (Kontrolle)	Anzahl	9	1	0	10
		% von Gruppe	90,0%	10,0%	,0%	100,0%
Gesamt		Anzahl	24	14	2	40
		% von Gruppe	60,0%	35,0%	5,0%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (1- seitig)	Punkt- Wahrscheinlich keit
Chi-Quadrat nach Pearson	24,429(a)	6	,000	,000		
Kontinuitätskorrektur						
Likelihood-Quotient	29,426	6	,000	,000		
Exakter Test nach Fisher	23,384			,000		
Zusammenhang linear-mit-linear	18,181(b)	1	,000	,000	,000	,000
Anzahl der gültigen Fälle	40					

a 8 Zellen (66,7%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist ,50.

b Die standardisierte Statistik ist -4,264.

=> Signifikante Abhängigkeit zwischen den Gruppen (Dosen) und der Bewertung der Schnelligkeit nach 13 Tagen (Chi-Quadrat-Test auf linearen Trend, exakt, $p < 0,001$)

Gruppe * Antrieb 14 Tage Kreuztabelle

			Schnelligkeit 14 Tage			Gesamt
			2	3	4	2
Gruppe	A (240mg/kg)	Anzahl	0	7	3	10
		% von Gruppe	,0%	70,0%	30,0%	100,0%
	B (120mg/kg)	Anzahl	10	0	0	10
		% von Gruppe	100,0%	,0%	,0%	100,0%
	C (60mg/kg)	Anzahl	10	0	0	10
		% von Gruppe	100,0%	,0%	,0%	100,0%
	D (Kontrolle)	Anzahl	10	0	0	10
		% von Gruppe	100,0%	,0%	,0%	100,0%
Gesamt		Anzahl	30	7	3	40
		% von Gruppe	75,0%	17,5%	7,5%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (1- seitig)	Punkt- Wahrscheinlich keit
Chi-Quadrat nach Pearson	40,000(a)	6	,000	,000		
Kontinuitätskorrektur						
Likelihood-Quotient	44,987	6	,000	,000		
Exakter Test nach Fisher	32,909			,000		
Zusammenhang linear-mit-linear	20,074(b)	1	,000	,000	,000	,000
Anzahl der gültigen Fälle	40					

a 8 Zellen (66,7%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist ,75.

b Die standardisierte Statistik ist -4,480.

=> Signifikante Abhängigkeit zwischen den Gruppen (Dosen) und der Bewertung der Schnelligkeit nach 14 Tagen (Chi-Quadrat-Test auf linearen Trend, exakt, $p < 0,001$)

10.2.3 Neurologisches Defizit

Test auf Abhängigkeit erst ab Tag 12 möglich, da vorher alle Bewertung 4 haben:

Gruppe * Neurologisches Defizit 12 Tage Kreuztabelle

			Neurologisches Defizit 12 Tage		Gesamt
			3	4	3
Gruppe	A (240mg/kg)	Anzahl	0	10	10
		% von Gruppe	,0%	100,0%	100,0%
	B (120mg/kg)	Anzahl	2	8	10
		% von Gruppe	20,0%	80,0%	100,0%
	C (60mg/kg)	Anzahl	1	9	10
		% von Gruppe	10,0%	90,0%	100,0%
	D (Kontrolle)	Anzahl	1	9	10
		% von Gruppe	10,0%	90,0%	100,0%
Gesamt		Anzahl	4	36	40
		% von Gruppe	10,0%	90,0%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (1- seitig)	Punkt- Wahrscheinlich keit
Chi-Quadrat nach Pearson	2,222(a)	3	,528	,891		
Kontinuitätskorrektur						
Likelihood-Quotient	2,995	3	,392	,891		
Exakter Test nach Fisher	2,211			,891		
Zusammenhang linear-mit-linear	,217(b)	1	,642	,820	,410	,161
Anzahl der gültigen Fälle	40					

a. 4 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 1,00.

b. Die standardisierte Statistik ist -,465.

=> keine Abhängigkeit nachweisbar zwischen der Gruppe (Dosis) und dem Neurologischen Defizit nach 12 Tagen (Chi-Quadrat-Test auf linearen Trend exakt, $p=0,820$)

Gruppe * Neurologisches Defizit 13 Tage Kreuztabelle

			Neurologisches Defizit 13 Tage		Gesamt
			3	4	3
Gruppe	A (240mg/kg)	Anzahl	0	10	10
		% von Gruppe	,0%	100,0%	100,0%
	B (120mg/kg)	Anzahl	2	8	10
		% von Gruppe	20,0%	80,0%	100,0%
	C (60mg/kg)	Anzahl	4	6	10
		% von Gruppe	40,0%	60,0%	100,0%
	D (Kontrolle)	Anzahl	3	7	10
		% von Gruppe	30,0%	70,0%	100,0%
Gesamt		Anzahl	9	31	40
		% von Gruppe	22,5%	77,5%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (1- seitig)	Punkt- Wahrscheinlich keit
Chi-Quadrat nach Pearson	5,018(a)	3	,170	,233		
Kontinuitätskorrektur						
Likelihood-Quotient	6,968	3	,073	,183		
Exakter Test nach Fisher	5,175			,233		
Zusammenhang linear-mit-linear	3,383(b)	1	,066	,093	,047	,026
Anzahl der gültigen Fälle	40					

a 4 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 2,25.

b Die standardisierte Statistik ist -1,839.

=> keine Abhängigkeit nachweisbar zwischen der Gruppe (Dosis) und dem Neurologischen Defizit nach 13 Tagen (Chi-Quadrat-Test auf linearen Trend exakt, $p=0,093$)

Gruppe * Neurologisches Defizit 14 Tage Kreuztabelle

			Neurologisches Defizit 14 Tage		Gesamt
			3	4	3
Gruppe	A (240mg/kg)	Anzahl	0	10	10
		% von Gruppe	,0%	100,0%	100,0%
	B (120mg/kg)	Anzahl	4	6	10
		% von Gruppe	40,0%	60,0%	100,0%
	C (60mg/kg)	Anzahl	5	5	10
		% von Gruppe	50,0%	50,0%	100,0%
	D (Kontrolle)	Anzahl	5	5	10
		% von Gruppe	50,0%	50,0%	100,0%
Gesamt		Anzahl	14	26	40
		% von Gruppe	35,0%	65,0%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (1- seitig)	Punkt- Wahrscheinlich keit
Chi-Quadrat nach Pearson	7,473(a)	3	,058	,092		
Kontinuitätskorrektur						
Likelihood-Quotient	10,610	3	,014	,032		
Exakter Test nach Fisher	8,330			,043		
Zusammenhang linear-mit-linear	5,486(b)	1	,019	,026	,013	,008
Anzahl der gültigen Fälle	40					

a 4 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 3,50.

b Die standardisierte Statistik ist -2,342.

=> signifikante Abhängigkeit zwischen der Gruppe (Dosis) und dem Neurologischen Defizit nach 14 Tagen (Chi-Quadrat-Test auf linearen Trend exakt, $p=0,026$)

10.2.4 Aggressivität

Gruppe * Aggressivität 8 Tage Kreuztabelle

			Aggressivität 8 Tage		Gesamt
			3	4	3
Gruppe	A (240mg/kg)	Anzahl	0	10	10
		% von Gruppe	,0%	100,0%	100,0%
	B (120mg/kg)	Anzahl	0	10	10
		% von Gruppe	,0%	100,0%	100,0%
	C (60mg/kg)	Anzahl	9	1	10
		% von Gruppe	90,0%	10,0%	100,0%
	D (Kontrolle)	Anzahl	10	0	10
		% von Gruppe	100,0%	,0%	100,0%
Gesamt		Anzahl	19	21	40
		% von Gruppe	47,5%	52,5%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (1- seitig)	Punkt- Wahrscheinlich keit
Chi-Quadrat nach Pearson	36,391(a)	3	,000	,000		
Kontinuitätskorrektur						
Likelihood-Quotient	48,850	3	,000	,000		
Exakter Test nach Fisher	39,727			,000		
Zusammenhang linear-mit-linear	29,734(b)	1	,000	,000	,000	,000
Anzahl der gültigen Fälle	40					

a 4 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 4,75.

b Die standardisierte Statistik ist -5,453.

=> Signifikante Abhängigkeit zwischen den Gruppen (Dosen) und der Bewertung der Aggressivität nach 8 Tagen (Chi-Quadrat-Test auf linearen Trend, exakt, $p < 0,001$)

Gruppe * Aggressivität 9 Tage Kreuztabelle

			Aggressivität 9 Tage			Gesamt
			2	3	4	2
Gruppe	A (240mg/kg)	Anzahl	0	0	10	10
		% von Gruppe	,0%	,0%	100,0%	100,0%
	B (120mg/kg)	Anzahl	0	2	8	10
		% von Gruppe	,0%	20,0%	80,0%	100,0%
	C (60mg/kg)	Anzahl	3	7	0	10
		% von Gruppe	30,0%	70,0%	,0%	100,0%
	D (Kontrolle)	Anzahl	3	7	0	10
		% von Gruppe	30,0%	70,0%	,0%	100,0%
Gesamt		Anzahl	6	16	18	40
		% von Gruppe	15,0%	40,0%	45,0%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (1- seitig)	Punkt- Wahrscheinlich keit
Chi-Quadrat nach Pearson	33,944(a)	6	,000	,000		
Kontinuitätskorrektur						
Likelihood-Quotient	46,390	6	,000	,000		
Exakter Test nach Fisher	35,350			,000		
Zusammenhang linear-mit-linear	23,897(b)	1	,000	,000	,000	,000
Anzahl der gültigen Fälle	40					

a. 12 Zellen (100,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 1,50.

b. Die standardisierte Statistik ist -4,888.

=> Signifikante Abhängigkeit zwischen den Gruppen (Dosen) und der Bewertung der Aggressivität nach 9 Tagen (Chi-Quadrat-Test auf linearen Trend, exakt, $p < 0,001$)

Gruppe * Aggressivität 10 Tage Kreuztabelle

			Aggressivität 10 Tage			Gesamt
			2	3	4	2
Gruppe	A (240mg/kg)	Anzahl	0	0	10	10
		% von Gruppe	,0%	,0%	100,0%	100,0%
	B (120mg/kg)	Anzahl	0	10	0	10
		% von Gruppe	,0%	100,0%	,0%	100,0%
	C (60mg/kg)	Anzahl	6	4	0	10
		% von Gruppe	60,0%	40,0%	,0%	100,0%
	D (Kontrolle)	Anzahl	6	4	0	10
		% von Gruppe	60,0%	40,0%	,0%	100,0%
Gesamt		Anzahl	12	18	10	40
		% von Gruppe	30,0%	45,0%	25,0%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (1- seitig)	Punkt- Wahrscheinlich keit
Chi-Quadrat nach Pearson	53,333(a)	6	,000	,000		
Kontinuitätskorrektur						
Likelihood-Quotient	58,447	6	,000	,000		
Exakter Test nach Fisher	44,375			,000		
Zusammenhang linear-mit-linear	25,964(b)	1	,000	,000	,000	,000
Anzahl der gültigen Fälle	40					

a 12 Zellen (100,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 2,50.

b Die standardisierte Statistik ist -5,096.

=> Signifikante Abhängigkeit zwischen den Gruppen (Dosen) und der Bewertung der Aggressivität nach 10 Tagen (Chi-Quadrat-Test auf linearen Trend, exakt, $p < 0,001$)

Gruppe * Aggressivität 11 Tage Kreuztabelle

		Aggressivität 11 Tage			Gesamt	
		2	3	4	2	
Gruppe	A (240mg/kg)	Anzahl	0	7	3	10
		% von Gruppe	,0%	70,0%	30,0%	100,0%
	B (120mg/kg)	Anzahl	2	8	0	10
		% von Gruppe	20,0%	80,0%	,0%	100,0%
	C (60mg/kg)	Anzahl	9	1	0	10
		% von Gruppe	90,0%	10,0%	,0%	100,0%
	D (Kontrolle)	Anzahl	10	0	0	10
		% von Gruppe	100,0%	,0%	,0%	100,0%
Gesamt	Anzahl	21	16	3	40	
	% von Gruppe	52,5%	40,0%	7,5%	100,0%	

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (1- seitig)	Punkt- Wahrscheinlich keit
Chi-Quadrat nach Pearson	35,738(a)	6	,000	,000		
Kontinuitätskorrektur						
Likelihood-Quotient	43,199	6	,000	,000		
Exakter Test nach Fisher	33,543			,000		
Zusammenhang linear-mit-linear	25,951(b)	1	,000	,000	,000	,000
Anzahl der gültigen Fälle	40					

a 8 Zellen (66,7%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist ,75.

b Die standardisierte Statistik ist -5,094.

=> Signifikante Abhängigkeit zwischen den Gruppen (Dosen) und der Bewertung der Aggressivität nach 11 Tagen (Chi-Quadrat-Test auf linearen Trend, exakt, $p < 0,001$)

Gruppe * Aggressivität 12 Tage Kreuztabelle

		Aggressivität 12 Tage			Gesamt	
		2	3	4	2	
Gruppe	A (240mg/kg)	Anzahl	0	9	1	10
		% von Gruppe	,0%	90,0%	10,0%	100,0%
	B (120mg/kg)	Anzahl	4	6	0	10
		% von Gruppe	40,0%	60,0%	,0%	100,0%
	C (60mg/kg)	Anzahl	9	1	0	10
		% von Gruppe	90,0%	10,0%	,0%	100,0%
	D (Kontrolle)	Anzahl	9	1	0	10
		% von Gruppe	90,0%	10,0%	,0%	100,0%
Gesamt		Anzahl	22	17	1	40
		% von Gruppe	55,0%	42,5%	2,5%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (1- seitig)	Punkt- Wahrscheinlich keit
Chi-Quadrat nach Pearson	24,364(a)	6	,000	,000		
Kontinuitätskorrektur						
Likelihood-Quotient	29,810	6	,000	,000		
Exakter Test nach Fisher	25,536			,000		
Zusammenhang linear-mit-linear	19,948(b)	1	,000	,000	,000	,000
Anzahl der gültigen Fälle	40					

a. 8 Zellen (66,7%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist ,25.

b. Die standardisierte Statistik ist -4,466.

=> Signifikante Abhängigkeit zwischen den Gruppen (Dosen) und der Bewertung der Aggressivität nach 12 Tagen (Chi-Quadrat-Test auf linearen Trend, exakt, $p < 0,001$)

Gruppe * Aggressivität 13 Tage Kreuztabelle

			Aggressivität 13 Tage		Gesamt
			2	3	2
Gruppe	A (240mg/kg)	Anzahl	0	10	10
		% von Gruppe	,0%	100,0%	100,0%
	B (120mg/kg)	Anzahl	10	0	10
		% von Gruppe	100,0%	,0%	100,0%
	C (60mg/kg)	Anzahl	10	0	10
		% von Gruppe	100,0%	,0%	100,0%
	D (Kontrolle)	Anzahl	10	0	10
		% von Gruppe	100,0%	,0%	100,0%
Gesamt		Anzahl	30	10	40
		% von Gruppe	75,0%	25,0%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (1- seitig)	Punkt- Wahrscheinlich keit
Chi-Quadrat nach Pearson	40,000(a)	3	,000	,000		
Kontinuitätskorrektur						
Likelihood-Quotient	44,987	3	,000	,000		
Exakter Test nach Fisher	35,103			,000		
Zusammenhang linear-mit-linear	23,400(b)	1	,000	,000	,000	,000
Anzahl der gültigen Fälle	40					

a 4 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 2,50.

b Die standardisierte Statistik ist -4,837.

=> Signifikante Abhängigkeit zwischen den Gruppen (Dosen) und der Bewertung der Aggressivität nach 13 Tagen (Chi-Quadrat-Test auf linearen Trend, exakt, $p < 0,001$)

Gruppe * Aggressivität 14 Tage Kreuztabelle

			Aggressivität 14 Tage		Gesamt
			2	3	2
Gruppe	A (240mg/kg)	Anzahl	0	10	10
		% von Gruppe	,0%	100,0%	100,0%
	B (120mg/kg)	Anzahl	10	0	10
		% von Gruppe	100,0%	,0%	100,0%
	C (60mg/kg)	Anzahl	10	0	10
		% von Gruppe	100,0%	,0%	100,0%
	D (Kontrolle)	Anzahl	10	0	10
		% von Gruppe	100,0%	,0%	100,0%
Gesamt		Anzahl	30	10	40
		% von Gruppe	75,0%	25,0%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (1- seitig)	Punkt- Wahrscheinlich keit
Chi-Quadrat nach Pearson	40,000(a)	3	,000	,000		
Kontinuitätskorrektur						
Likelihood-Quotient	44,987	3	,000	,000		
Exakter Test nach Fisher	35,103			,000		
Zusammenhang linear-mit-linear	23,400(b)	1	,000	,000	,000	,000
Anzahl der gültigen Fälle	40					

a. 4 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 2,50.

b. Die standardisierte Statistik ist -4,837.

=> Signifikante Abhängigkeit zwischen den Gruppen (Dosen) und der Bewertung der Aggressivität nach 14 Tagen (Chi-Quadrat-Test auf linearen Trend, exakt, $p < 0,001$)